

На правах рукописи

**ВАФИН РАМИЛЬ РИШАДОВИЧ**

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ХЛАМИДИЙ  
(геномика, таксономия, индикация и идентификация)**

03.00.07 – Микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Казань – 2009

Работа выполнена в Федеральном государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана

**Научный консультант:** доктор ветеринарных наук, профессор  
**Равилов Рустам Хамитович**

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор  
**Ильинская Ольга Николаевна**

доктор медицинских наук, профессор  
**Поздеев Оскар Кимович**

доктор биологических наук, профессор  
**Васильев Дмитрий Аркадьевич**

**Ведущая организация:** ГОУ ВПО  
**«Российский университет дружбы народов»**

Защита диссертации состоится «3» декабря 2009 г. в «   » часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при Казанском государственном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке им. Н.И.Лобачевского Казанского государственного университета.

Автореферат разослан «   »                      2009 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор биологических наук, профессор

**З.И. Абрамова**

## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Научные достижения последних десятилетий в области молекулярной биологии, генетики, биохимии, пересекающиеся с микробиологией, вирусологией, иммунологией и другими смежными дисциплинами, привели к созданию, развитию и внедрению в практику диагностических лабораторий молекулярно-генетических методов исследования геномов эукариот, прокариот и вирусов. Генодиагностические подходы, базовыми направлениями которых являются гибридизационные, амплификационные, сиквенсные и другие технологии ДНК/РНК-анализа, постоянно совершенствующиеся в плане специфичности, чувствительности, экономии и безопасности, позволяют осуществлять широкий спектр задач индикации и идентификации биологических объектов. На сегодняшний день они являются одними из самых эффективных приемов при постановке диагноза на инфекционные болезни (P. Singleton, 2000; N. Woodford et al., 2004; G.J. Viljoen et al., 2005; M. Klint et al., 2007; K. Sachse et al., 2008). В этом плане весьма актуальным представляется решение вопросов номенклатуры и классификации микроорганизмов, что является основой идентификации болезнетворных агентов.

Хламидиозы – группа разнообразных по проявлению контагиозных болезней животных, возбудителями которых являются внутриклеточные микроорганизмы со своеобразным циклом развития (J. Storz, 1988). Геномы хламидий являются перспективным объектом исследования, а генетический критерий идентификации служит одной из конструктивных звеньев построения их классификации (K.D. Everett et al., 1999a, 1999b; J.C. Hartley et al., 2001; M. Van Loock, 2003; N.R. Thomson et al., 2005, 2008; R.S. Stephens et al., 2009).

Особенностью хламидиозов, значительно усложняющей контроль за развитием заболевания, является частое латентное или хроническое течение со стертой клинической картиной. Кроме того, обладая низкой иммуногенностью, не обеспечивающей выработку достаточного количества антител, инфекция часто приобретает персистирующий характер и способствует образованию тлеющего очага.

Лабораторные методы диагностики хламидиоза, основанные на обнаружении возбудителя путем световой и люминесцентной микроскопии, выделении инфекционного агента на куриных эмбрионах, выявлении в сыворотках крови больных и переболевших животных специфических антител, имеют ряд недостатков, связанных с низкой чувствительностью и специфичностью, а также длительностью получения ответа. Это обуславливает необходимость изыскания и внедрения чувствительных средств диагностики, позволяющих выявлять хламидии при любой форме проявления инфекционного процесса (J.C. Hartley et al., 2001; K. Sachse et al., 2009).

Исходя из этого, перспективным направлением является совершенствование лабораторной диагностики хламидиозов на основе молекулярно-генетических методов исследования.

**Цель и задачи исследования.** Цель исследования – создание научно-практических основ генодиагностики биологических объектов и проведение системного молекулярно-генетического анализа хламидий на предмет их таксономической принадлежности.

В соответствии с целью работы для решения были поставлены следующие задачи:

- разработать способ выделения нуклеиновых кислот хламидий для получения препаратов ДНК высокой степени чистоты и нативности;
- разработать способ проведения ПЦР, обеспечивающий эффективную наработку специфичных ампликонов с исключением амплификации неспецифичных продуктов реакции;
- разработать способ деконтаминации амплификационных реакций на основе урацил-ДНК-гликозилазного метода защиты от контаминации;
- провести комплекс исследований по выяснению этиологической роли хламидий в патологии клеточных пушных зверей, птиц, рептилий и амфибий;
- подобрать условия проведения индикации и идентификации хламидий в клиническом и патологическом материале методами ПЦР и ПЦР-ПДРФ-анализа;
- провести молекулярно-генетические исследования типичных представителей рода *Chlamydophila* штаммов «Ростиново-70», «250», «ПП-87» и «КС-93» на предмет их таксономической принадлежности на основании сравнительного анализа по *omp1*-, *omp2*-, *16S pPHK*- и *23S pPHK*-генам с соответствующими фрагментами геномов официально зарегистрированных видов хламидий, а также по наличию экстрахромосомной плазмиды.

#### **Научная новизна.**

- Впервые на основании системного молекулярно-генетического анализа представителей семейства *Chlamydiaceae* охарактеризован новый, ранее не изученный генотип хламидий, обозначенный нами «генотип G», с предложением соотнесения изолированных от млекопитающих при абортах штаммов «Ростиново-70», «250», «ПП-87» и «КС-93» рода *Chlamydophila* в новый вид хламидий, *Chlamydophila parapsittaci sp.nov.*
- Разработка фенольно-детергентного способа выделения ДНК хламидий (Патент РФ на изобретение № 2230120 – «Способ выделения ДНК микроорганизмов»).
- Разработка методики высокоточной ПЦР (Патент РФ на изобретение № 2299240 – «Способ проведения ПЦР»).
- Разработка способа защиты ОТ-ПЦР от контаминации продуктами амплификации на основе разрушающего действия урацил-ДНК-гликозилазы (из *E. coli*) (Патент РФ на изобретение № 2307167).

Научная новизна и приоритет разработок диссертации защищены охраноспособными документами, отражены в публикациях ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК и глобальной

электронной базе данных генбанков NCBI (США), EMBL (Великобритания), DDBJ (Япония).

#### **Научно-практическая значимость.**

- Результаты молекулярно-генетических исследований типичных представителей рода *Chlamydomytila* штаммов «Ростиново-70», «250», «ПП-87» и «КС-93», характеризующие собой новый, ранее не изученный генотип хламидий («генотип G»), с предложением выделения изученных штаммов в новый вид хламидий, *Chlamydomytila parapsittaci* sp.nov., существенно повышают уровень знаний о природе хламидийных инфекций и позволяют эффективно использовать полученную информацию в научно-практической деятельности ветеринарной и гуманитарной медицины.
- Разработан способ выделения ДНК хламидий для последующего молекулярно-генетического анализа. Предложенная разновидность фенольно-детергентного метода экстракции нуклеиновых кислот микроорганизмов проста в эксплуатации, экономична во времени и средствах, дает приемлемые результаты в отношении нативности, чистоты и концентрации препаратов ДНК хламидий.
- Разработан способ проведения полимеразной цепной реакции, являющийся действенной альтернативой разновидностям «точной» ПЦР, таким как «touch-up PCR» и «touch-down PCR». Предложенная методика высокоточной ПЦР позволяет значительно повысить специфичность амплификации интересующих участков геномов исследуемых биологических объектов.
- Разработан способ ферментативной деконтаминации амплификационных реакций на основе разрушающего действия урацил-ДНК-гликозилазы (из *E. coli*). Предложенный подход является действенным инструментом защиты ОТ-ПЦР в варианте «1 пробирка, 2 этапа» от загрязнения продуктами амплификации.
- Установлена хламидийная природа различных патологий у клеточных и домашних плотоядных животных, птиц, рептилий и амфибий; выделенные при этом изоляты микроорганизмов идентифицированы как хламидии.
- Подобраны условия проведения ПЦР-индикации и идентификации хламидий методом ПЦР-ПДРФ в исследуемом биоматериале, обеспечивающие высокую чувствительность и специфичность тестов.
- Подготовленные на основе научно-практической работы методические рекомендации используются в учебном процессе факультетов ветеринарной медицины сельскохозяйственных ВУЗов, для повышения квалификации специалистов ветеринарных лабораторий и при научных исследованиях.

#### **Апробация работы.** Основные положения диссертации доложены на:

- ежегодных итоговых заседаниях ученых советов ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана (2002-2008 гг.);
- ежегодных итоговых заседаниях ученых советов ГНУ «Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства» РАСХН (2004-2006 гг.);

- Всероссийской научно-практической конференции по актуальным проблемам ветеринарии и зоотехнии (Казань 2002 г.);
- научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии и ветеринарной медицины мелких домашних животных» (Киров, 2002 г.);
- X-XII, XIV и XV Московских международных ветеринарных конгрессах (Москва, 2002-2004, 2006, 2007 гг.);
- IV региональной научно-практической конференции «Ветеринарная медицина. Современные проблемы и перспективы развития» (Саратов, 2004 г.);
- научно-практической конференции «Ветеринарная медицина домашних животных» (Казань. 2005 и 2006 гг.);
- научно-практической конференции молодых ученых ФГОУ ВПО «Казанская академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана» (Казань, 2006 г.).

**Публикация результатов исследования.** По теме диссертации опубликовано 55 работ, в том числе 10 публикаций в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК, 4 методические рекомендации, 3 патента РФ на изобретения, 1 монография и 15 депонированных в глобальных базах данных генбанков NCBI, EMBL и DDBJ публикаций нуклеотидных последовательностей локусов *omp1*-, *omp2*-, *16S pPHK*-, *23S pPHK*-генов и экстрахромосомной плазмиды хламидий штамма «Ростиново-70».

#### **Основные положения, выносимые на защиту.**

- Штаммы хламидий «Ростиново-70», «250», «ПП-87» и «КС-93» рода *Chlamydophila* по генетическому (анализ *omp1*-, *omp2*-, *16S pPHK*- и *23S pPHK*-генов хламидий и наличия экстрахромосомной плазмиды) и экологическому (изолированы от млекопитающих при абортах) критериям охарактеризованы как ранее не изученный генотип («генотип G») и предложены для выделения в новый вид – *Chlamydophila parapsittaci* sp. nov.
- Фенольно-детергентный способ выделения ДНК хламидий позволяет получать чистые, нативные и концентрированные препараты нуклеиновых кислот возбудителя.
- Методика высокоточной ПЦР обеспечивает эффективную наработку специфичных ампликонов с исключением амплификации неспецифичных продуктов реакции.
- Способ защиты ОТ-ПЦР от контаминации продуктами амплификации на основе разрушающего действия урацил-ДНК-гликозилазы (из *E. coli*) предотвращает возможность реамплификации урацил-содержащих ампликонов при использовании заявленного протокола ОТ-ПЦР в варианте «1 пробирка, 2 этапа».
- Различные патологии у клеточных и домашних плотоядных животных, декоративных птиц, рептилий и амфибий имеют хламидийную природу, подтвержденную результатами комплексных исследований.
- Подобранные условия индикации и идентификации хламидий в исследуемом биоматериале методами ПЦР и ПЦР-ПДРФ обеспечивают высокую чувствительность и специфичность анализа.

**Объем и структура диссертационной работы.** Диссертация изложена на 290 страницах компьютерного текста (текстовый редактор «Microsoft Word 2003», стиль «Times New Roman», размер шрифта 14 пт, интервал полуторный) и включает: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследования, выводы, практические предложения, список использованной литературы (всего 470 источников, в том числе 416 иностранных) и приложения. Диссертация иллюстрирована 21 таблицами, 30 рисунками и 8 схемами. Прилагаются документы, подтверждающие научно-практическую значимость работы.

## **СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Исследования проводились в 1999-2008 годы на кафедре патологии мелких животных и оперативной хирургии, кафедре эпизоотологии ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана»; в лаборатории биохимического и молекулярного анализа биологических средств в объектах ветеринарного надзора и лаборатории контроля и индикации возбудителей вирусных и хламидийных инфекций в объектах ветеринарного надзора Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института (г. Казань) (ныне ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»); в лаборатории молекулярно-генетических исследований ГНУ «Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Российской академии сельскохозяйственных наук» (г. Казань), в лабораториях НПО «СибЭнзим» (г. Новосибирск), в отделе генно-молекулярной диагностики ФГУ «Татарская межрегиональная ветеринарная лаборатория» (г. Казань), в ГУЗ «Республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями МЗ РТ» (г. Казань), в ГУ «Республиканская ветеринарная лаборатория РТ» (г. Казань), в зверосовхозе «Вятский» Кировской области РФ, в КУК «Казанский зооботсад».

## **2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

В работе были использованы 5 штаммов хламидий: «Ростиново-70, «250», «БЛ-84», «ПП-87» и «КС-93» из коллекции микроорганизмов ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», выделенные соответственно от овцы, коровы, лисицы, песка и собаки.

Все штаммы адаптированы к размножению в куриных эмбрионах (КЭ).

Исследованный материал: лиофильно высушенные штаммы хламидий, клинический и патологический материал (сыворотки крови абортировавших лисиц, органы абортировавших и «неблагополучно» ощенившихся лисиц и собак; абортированные плоды лисиц; щенки лисиц и собак, павшие в первые дни жизни; моча и соскобы с конъюнктивы кошек; мазки со слизистых оболочек глаз, ротовой полости и клоаки у рептилий; мазки со слизистой оболочки клоаки у амфибий; соскобы с клоаки у птиц, рептилий и амфибий; сыворотки крови рептилий, амфибий и птиц), цельная кровь крупного рогатого скота, инфицированные PVY и PVX растения картофеля.

Эпизоотологическое обследование проводили в зверосовхозе «Вятский» Кировской области РФ. При этом были использованы: зоотехническая и ветеринарная учетная документация; собеседование со специалистами и обслуживающим персоналом; собственные клинические наблюдения.

Учитывали условия кормления и содержания животных; результаты щенения самок и сохранность молодняка в первые дни после рождения; благополучие поголовья по инфекционным болезням; возможные источники хламидийной инфекции и пути ее передачи; результаты лабораторных исследований патологического материала и сывороток крови лисиц.

Лабораторную диагностику хламидиоза ставили бактериоскопическим (световая и люминесцентная микроскопия), вирусологическим (заражение развивающихся куриных эмбрионов), серологическими (РСК и ИФА), и молекулярно-генетическими (ПЦР, ПЦР-ПДРФ, секвенирование) методами.

При очистке и концентрировании хламидий использовали схему, включающую: инактивацию возбудителя, разрушение клеточных элементов КЭ для освобождения элементарных телец хламидий, дифференциальное и на градиенте сахарозы центрифугирование суспензии биомассы.

Все операции с исходной и концентрированной биомассами хламидий выполняли в стерильных условиях после инактивации возбудителя. Инактивацию проводили в водяной бане при 60°C в течение 60 минут.

Для выделения ДНК хламидий использовали разработанный нами фенольно-детергентный способ. Также применяли способ щелочного лизиса по Н. Birnboim et al. (1979); способ J. Marmur (1961); способ L. Gafford et al. (1967), модифицированный А.Р. Садриевым с соавт. (1999) (рис. 1).

Пробоподготовка исследованного материала (биомасса хламидий, клинический и патологический материал от млекопитающих, птиц, рептилий и амфибий, инфицированные PVY и PVX растения картофеля) также осуществлялась сорбционным способом («ДНК-сорб» и «Рибосорб», ЦНИИЭМ, Россия).

ДНК из лейкоцитов крупного рогатого скота выделяли оптимизированным нами комбинированным щелочным способом.

При совершенствовании способов генодиагностики протестирован разработанный нами способ проведения ПЦР на предмет диагностики хламидиозов животных в сравнении с классическим аналогом.

**Классическую ПЦР** проводили на программируемом термоциклере «Терцик» (Россия) в объеме 20 мкл, содержащей 60 мМ Трис-HCl (pH 8,5), 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 25 мМ KCl, 10 мМ меркаптоэтанол; 0,1 мМ тритон X-100; 0,2 мМ dNTPs, 0.5 ед Taq ДНК полимеразы, 0.25 мкМ праймера Ch1: 5'-ATGTCCAAACTCATCAGACGAG-3' (расчетная  $T_m=58,4^{\circ}\text{C}$ ), 0,25 мкМ праймера Ch2: 5'-CCTTCTTTAAGAGGTTTACCCA-3' (расчетная  $T_m=57,9^{\circ}\text{C}$ ), сконструированных J.C. Hartley et al. (2001) для амплификации фрагмента *omp2*-гена хламидий семейства *Chlamydiaceae* длиной 557-590 bp, 1 мкл исследуемой пробы ДНК в режиме:  $\times 1: 94^{\circ}\text{C} - 4 \text{ мин}; \times 40: 94^{\circ}\text{C} - 30 \text{ сек}, 55^{\circ}\text{C} - 30 \text{ сек}, 72^{\circ}\text{C} - 30 \text{ сек}; \times 1: 72^{\circ}\text{C} - 10 \text{ мин}$  (рис. 3-4).



В качестве положительной пробы использовали ДНК хламидий штамма «Ростиново-70» (амплификации фрагмента *omp2*-гена длиной 587 bp).

**Разработанный способ ПЦР** проводили на программируемом термоциклере PTC 200 NJ Research (США) и «Терцик» (Россия) в объеме 20 мкл, содержащей 60 мМ Трис-НСl (рН 8,5), 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 25 мМ KCl, 10 мМ меркаптоэтанол; 0,1 мМ тритон X-100; 0,2 мМ dNTPs, 0.5 ед Taq ДНК полимеразы, 0.25 мкМ праймера Ch1-hs с 5'-некомплементарным участком (*n*) длиной 5 нуклеотидов и 3'-комплементарным участком (*N*) длиной 22 нуклеотида: 5'-gggggATGTCCAAACTCATCAGACGAG-3' (расчетная *nN*  $T_m$ =68,7<sup>0</sup>С; *N*  $T_m$ =58,4<sup>0</sup>С), 0,25 мкМ праймера Ch2-hs с 5'-некомплементарным участком (*n*) длиной 5 нуклеотидов и 3'-комплементарным участком (*N*) длиной 23 нуклеотида: 5'-cccccCCTTCTTTAAGAGGTTTACCCCA-3' (расчетная *nN*  $T_m$ =70,0<sup>0</sup>С; *N*  $T_m$ =57,9<sup>0</sup>С), 1 мкл исследуемой пробы ДНК в **режиме градиентной ПЦР**: ×1: 94<sup>0</sup>С – 4 мин; ×40: 94<sup>0</sup>С – 30 сек, 55-65<sup>0</sup>С – 30 сек, 72<sup>0</sup>С – 30 сек; ×1: 72<sup>0</sup>С – 10 мин (рис. 2) и **оптимизированном режиме амплификации**: ×1: 94<sup>0</sup>С – 4 мин; ×40: 94<sup>0</sup>С – 30 сек, 60<sup>0</sup>С – 30 сек, 72<sup>0</sup>С – 30 сек; ×1: 72<sup>0</sup>С – 10 мин (рис. 3-4).

В качестве положительной пробы использовали ДНК хламидий штамма «Ростиново-70» (амплификации специфичного фрагмента ДНК длиной 597 bp).

Для сопоставления внутренней структуры амплифицируемых с праймерами Ch1+Ch2 и Ch1-hs+Ch2-hs фрагментов *omp2*-гена хламидий штамма «Ростиново-70» проводили процедуру полного и неполного эндонуклеазного расщепления ферментом *AluI* (рис. 3) с учетом анализа картирования сайтов ее рестрикции (схема 1. NEBcutter v.2.0).

ПЦР-продукты, амплифицированные с вышеперечисленными праймерами для молекулярно-генетического анализа хламидий обрабатывались 1 ед *AluI* при 37<sup>0</sup>С в течение ночи (или в течении 1 часа при процедуре неполного эндонуклеазного расщепления) (10 мкл ПЦР-продукта, 7,0 мкл dH<sub>2</sub>O, 2,0 мкл 10×SE-буфера Y, 1 ед/мкл *AluI*).

При **разработке способа защиты ОТ-ПЦР от контаминации продуктами амплификации на основе разрушающего действия урацил-ДНК-гликозилазы** протестировано исполнение в варианте «1 пробирка, 2 этапа» при использовании М-MuLV обратной транскриптазы и Taq ДНК полимеразы путем комбинированного использования dTTP/dUTP.

При обосновании эффективности предложенного способа проводили дальнейшую процедуру реамплификацию урацил-содержащих ампликонов с урацил-ДНК-гликозилазой и без нее (рис. 5). В качестве диагностической модели использованы РНК-содержащие вирусы картофеля PVY и PVX.

В мультиплексной ОТ-ПЦР для амплификации и реамплификации участков генома Potato virus Y и Potato virus X использовали PVY специфичные [PPVYCP6P: 5'-CGTCCAAAATGAGAATGCC-3' и PPVYCP6M: 5'-TCTTGTGT ACTGATGCCAC-3'] (С. Varveri, 2000) и PVX специфичные [PPVXv1: 5'-GACA СТАТGGCACAGGCTGCTTGG-3' и PPVXv2: 5'-TTGGGCAGCATTCATTTTCAG CTTC-3'] (А.М. Soliman, 2000) праймеры, соответственно (рис. 5).

Разработанный нами способ защиты ОТ-ПЦР от контаминации продуктами амплификации протестирован на предмет индикации хламидий по *23S pPHK* с праймерами U23F: 5'-GATGCCTTGGCATTGATAGGCGATGAAGG A-3' и 23Sigr: 5'-TGGCTCATCATGCAAAAGGCA-3' в альтернативной стратегии амплификации (K.D. Everett et al., 1999b) (рис. 6).

ПЦР-индикацию хламидий в пробах материала, взятого от млекопитающих и птиц, осуществляли с использованием специфичных для вида *Chlamydia psittaci* (согласно нынешней классификации, для видов *Chlamydophila psittaci*, *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila felis* и *Chlamydophila caviae*) олигонуклеотидных праймеров CPF: 5'-GCAAGACACTC CTCAAAGCC-3' и CPR: 5'-CCTTCCCACATAGTGCCATC-3' (R. G. Hewinson et al., 1997). Разработанный ПЦР-тест основан на амплификации фрагмента ДНК хламидий длиной 264 пар нуклеотидов (bp), который включает в себя 5'-не транслируемый регион и часть гена *Chlamydia psittaci*, кодирующего синтез основного белка наружной мембраны возбудителя (рис. 7-9).

Амплификацию участка генома хламидий длиной 264 bp проводили в термоциклере «Терцик» («ДНК-технология», Россия) в объеме 25 мкл реакционной смеси, содержащей 60 mM Трис-HCl (pH 8,5), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM KCl, 10 mM меркаптоэтанол; 0,1 mM тритон X-100; 0,2 mM dNTPs, 1 ед Taq ДНК полимеразы, по 0.2 мкМ праймера CPF и CPR и 2 мкл исследуемой пробы ДНК.

ПЦР с пробами материала, взятого от рептилий и амфибий, проводили с использованием тест-системы «ХЛА-КОМ» для диагностики хламидиоза животных и птиц методом полимеразной цепной реакции («Амплисенс», Россия). Разработанный ПЦР-тест основан на амплификации специфичного для микроорганизмов семейства *Chlamydiaceae* фрагмента ДНК длиной 300 пар нуклеотидов (рис. 10).

При молекулярно-генетическом анализе хламидий для амплификации фрагмента *omp1*-гена хламидий использовали праймеры 5GPF: 5'-ACGCATGCAAGACACTCCTCAAAGCC-3' и 3GPB: 5'-ACGAATTCCTAGGTT CTGATAGCGGGAC-3' (B. Kaltenboeck et al., 1991, 1993); *omp2*-гена – Ch1: 5'-ATGTCCAAACTCATCAGACGAG-3' и Ch2: 5'-CCTTCTTTAAGAGGTTTTACC CA-3' (J.C. Hartley et al., 2001); *16S pPHK* – 16Sigr: 5'-CGGCGTGGATGAGGC AT-3' и 16Sigr: 5'-TCAGTCCCAGTGTTGGC-3' (K.D. Everett et al., 1999b); *23S pPHK* – U23F: 5'-GATGCCTTGGCATTGATAGGCGATGAAGGA-3' и 23Sigr: 5'-TGGCTCATCATGCAAAAGGCA-3' (K.D. Everett et al., 1999b); экстрахромосомной плазмиды – ML-PLF01: 5'-CAGAACGGTGTGTAGATT-3' и ML-PLR01: 5'-AGGAGATAAGGTTGCTAA-3' (M. Van Loock et al., 2003).

Амплификацию участков генома хламидий проводили в термоциклере «Терцик» («ДНК-технология», Россия).

Хламидийные *omp1*-, *omp2*-, *16S pPHK*-, *23S pPHK*-фрагменты и ДНК экстрахромосомной плазмиды были амплифицированы в объемах по 20 µl. Реакционные смеси содержали по 1 мкл исследуемого препарата ДНК, 0,2 mM dNTPs, по 0,5 мкМ каждого из соответствующих праймеров, 2 мкл 10×буфера

для Taq ДНК полимеразы и 1 ед Taq ДНК полимеразы. Режимы амплификации: **Отр1:** 1×94<sup>0</sup>С – 4 мин; 40×94<sup>0</sup>С – 1 мин, 59<sup>0</sup>С – 1 мин, 72<sup>0</sup>С – 1 мин; 1×72<sup>0</sup>С – 7 мин. **Отр2:** 1×94<sup>0</sup>С – 4 мин; 40×94<sup>0</sup>С – 1 мин, 55<sup>0</sup>С – 1 мин, 72<sup>0</sup>С – 1 мин; 1×72<sup>0</sup>С – 7 мин. **16S рРНК:** 1×94<sup>0</sup>С – 4 мин; 40×94<sup>0</sup>С – 30 сек, 51<sup>0</sup>С – 30 сек, 72<sup>0</sup>С – 30 сек; 1×72<sup>0</sup>С – 7 мин. **23S рРНК:** 1×94<sup>0</sup>С – 4 мин; 40×94<sup>0</sup>С – 30 сек, 61<sup>0</sup>С – 30 сек, 72<sup>0</sup>С – 30 сек; 1×72<sup>0</sup>С – 7 мин. **Экстрахромосомная плазмида:** 1×94<sup>0</sup>С – 4 мин; 40×94<sup>0</sup>С – 30 сек, 52<sup>0</sup>С – 30 сек, 72<sup>0</sup>С – 30 сек; 1×72<sup>0</sup>С – 7 мин.

ПЦР-продукты, амплифицированные с вышеперечисленными праймерами для молекулярно-генетического анализа хламидий обрабатывались 1 ед *AluI* при 37<sup>0</sup>С в течение ночи (10 мкл ПЦР-продукта, 7,0 мкл dH<sub>2</sub>O, 2,0 мкл 10×SE-буфера Y, 1 ед/мкл *AluI*).

ПЦР-продукты, амплифицированные с праймерами 5GPF и 3GPB обрабатывались 10 ед *HaeIII* при 37<sup>0</sup>С в течение ночи (10 мкл ПЦР-продукта, 7,0 мкл dH<sub>2</sub>O, 2,0 мкл 10×SE-буфера G, 10 ед/мкл *HaeIII*).

**ПЦР-ПДРФ-моделирование:** NEBcutter v.2.0 (<http://tools.neb.com/>).

**Детекция результатов ПЦР-ПДРФ** проведена методом горизонтального электрофореза в 2,5% агарозном геле в буфере TBE (рН 8,0) содержащем этидий бромид с последующей визуализацией результатов в ультрафиолетовом трансиллюминаторе (λ=310 нм). Размеры фрагментов ДНК оценивали по подвижности в сравнении со стандартными ДНК маркерами.

В работе были использованы продукты для молекулярно-биологических исследований производства ООО «СибЭнзим», Россия.

**Секвенирование** продуктов амплификации *otr1*-гена с праймерами 5GPF и 3GPB штаммов хламидий «Ростиново-70», «250», «ПП-87», «КС-93», а также *otr2*-гена с праймерами Ch1 и Ch2, *16S рРНК* с праймерами 16SIGF и 16SIGR, *23S рРНК* с праймерами U23F и 23SIGR штамма хламидий «Ростиново-70» выполнено на приборе ABI-300 в лабораториях НПО «СибЭнзим».

**GenBank A/N штамма «Ростиново-70»:** DQ177459 – локус *otr1*-гена; DQ177460 – локус *otr2*-гена; DQ663788 – локус *16S рРНК*; DQ663789 – локус *23S рРНК*; DQ663790 – локус экстрахромосомной плазмиды хламидий.

Штамм Ростиново-70 был выравнен по длине 881 нуклеотидов (н.) локуса *otr1*-гена (DQ177459, 1-881 н.); по длине 587 н. локуса *otr2*-гена (DQ177460, 1-587 н.); по длине 294 н. локуса *16S рРНК*-гена (DQ663788, 1-294 н.); и по длине 604 н. локуса *23S рРНК*-гена (DQ663789, 1-604 н.) с соответствующими опубликованными в GenBank NCBI нуклеотидными последовательностями штаммов микроорганизмов семейства *Chlamydiaceae*, используя программы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) и CLUSTAL W (v. 1.83) Multiple Sequence Alignments (<http://align.genome.jp/>). При построении филограмм представителей семейства *Chlamydiaceae* использовали алгоритм NJ.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. Совершенствование способов генодиагностики

##### 3.1.1. Разработка способа выделения ДНК хламидий

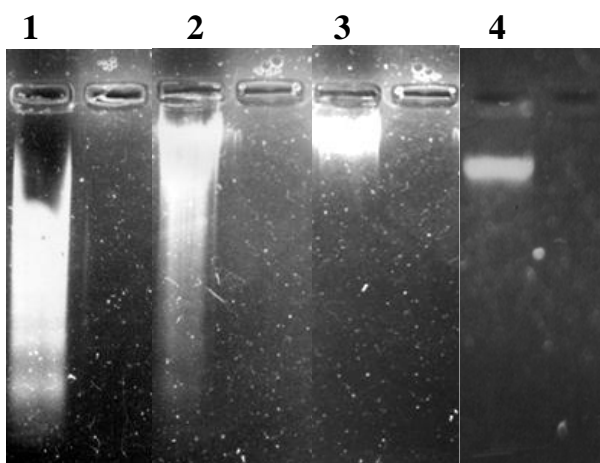
Всем молекулярно-генетическим методам диагностики предшествует этап выделения нуклеиновых кислот исследуемого биоматериала. Чистота и концентрация полученных препаратов нуклеиновых кислот обуславливают успех дальнейших исследований.

В данной работе выделение нуклеиновых кислот хламидий проводили по разработанному нами фенольно-детергентному способу. Принцип его заключается в том, что разделения реакционной смеси на две фазы (фенол-вода) не происходит за счет наличия фенолята натрия (1,2%) в лизирующем растворе, образующегося в результате взаимодействия фенола с едким натром. Благодаря образующейся однофазной системе достигается повышенная депротеинизирующая активность применяемой смеси с заменой резкого встряхивания препарата осторожным медленным перемешиванием, что, в конечном счете, сводит к минимуму гидродинамические воздействия на освобождающиеся нуклеиновые кислоты.

Спектрофотометрические показатели полученных препаратов нуклеиновых кислот хламидий варьировали в пределах 1,8-2,0; что говорит о высокой степени чистоты препаратов ДНК от примесей белков и фенола. Практический выход ДНК хламидий составил 18,7-20,4 мкг/мг сухой массы микроорганизмов, что соответствует 55-60%. Это свидетельствует о пригодности препаратов нуклеиновых кислот для молекулярно-генетических исследований.

Кроме указанного способа, для выделения ДНК хламидий были испытаны способы: щелочного лизиса по Н. Birnboim et al. (1979); J. Marmur (1961); L. Gafford et al. (1967), модифицированный А.Р. Садриевым с соавт. (1999).

Результаты этих исследований представлены на рис. 1.



**Рис. 1. ДНК хламидий, выделенные различными способами**

**Обозначения:**

- 1) способ щелочного лизиса Н. Birnboim et al. (1979);
- 2) способ J. Marmur (1961);
- 3) способ L. Gafford et al. (1967), модифицированный А.Р. Садриевым с соавт. (1999);
- 4) предложенный нами фенольно-детергентный способ выделения ДНК хламидий.

При выделении ДНК способам щелочного лизиса по Н. Birnboim et al (1979), несмотря на многочисленные попытки, получить нативные экстракты нуклеиновой кислоты не удалось. ДНК при этом разрушалась, о чем свидетельствовал шлейф по треку электрофоретической разгонки препаратов ДНК (рис. 1, трек 1).

Применение способа J. Marmur (1961) вызвало частичное разрушение ДНК (рис. 1, трек 2). Спектрофотометрические показатели полученных препаратов ДНК колебались в пределах 1,4-1,6, что говорит о наличии в препаратах нуклеиновой кислоты примесей белков, поэтому точное измерение количества ДНК в данном случае было невозможно.

При использовании способа L. Gafford et al. (1967) в модификации А.Р. Садриева (1999), структура ДНК не нарушалась, о чем свидетельствовало расположение фракции нуклеиновой кислоты в начале трека (рис. 1., трек 3). Спектрофотометрические показатели полученных препаратов ДНК колебались в пределах 1,8-2,0, что говорит о высокой степени чистоты препаратов ДНК от примесей белков. Практический выход ДНК хламидий составил 17,0-18,7 мкг/мг сухой массы микроорганизмов, что соответствует 50-55%. Однако отрицательным свойством данного способа экстракции нуклеиновых кислот является его длительность из-за того, что при использовании этого подхода необходимо проводить инкубацию реакционной смеси в течение 16-18 часов. Кроме того, указанный способ предполагает 4-х кратную экстракцию хлороформом, что в значительной степени усложняет процесс выделения ДНК.

Таким образом, нами разработан фенольно-детергентный способ выделения ДНК хламидий, преимущества которого заключаются в том, что он прост в эксплуатации, экономичен во времени и средствах, дает приемлемые результаты в отношении нативности (рис. 1., трек 4), чистоты и концентрации препаратов ДНК хламидий. Разработанный фенольно-детергентный способ выделения ДНК хламидий является изобретением, на которое получено решение Роспатент о выдаче патента РФ (№ 2230120).

### 3.1.2. Разработка способа проведения ПЦР

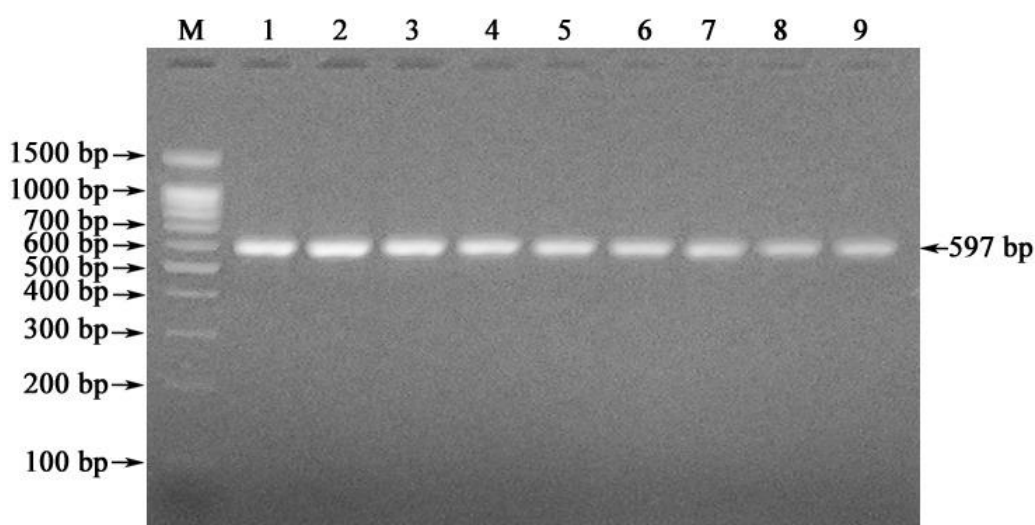
Задачей данного раздела исследования являлась разработка эффективной методики высокоточной ПЦР для индикации и идентификации биологических объектов.

Нами разработан способ проведения ПЦР, *схожий* с разновидностями «touch-up» ПЦР (M. Ailenberg et al., 2000; F. Weighardt et al., 1993) тем, что в качестве праймеров используют олигонуклеотиды, которые состоят из 3'-участка, комплементарного последовательности-мишени, и 5'-участка, не комплементарного последовательности-мишени, *отличающийся* тем, что в качестве праймеров используют олигонуклеотиды с потенциальной температурой гибридизации по всей длине, превышающей температуру отжига их 3'-комплемтарного участка на 5-10<sup>0</sup>С, а при проведении ПЦР отжиг ведут при температуре, соответствующей указанной потенциальной температуре гибридизации.

Стратегия выбранного подхода заключается в том, что, используя фиксированную температуру потенциального оптимума отжига праймеров по всей длине, связывание 3'-комплементарного участка олигонуклеотида с нуклеиновой кислотой исследуемого биологического объекта затруднительно в виду несоответствия температур гибридизации на 5-10<sup>0</sup>С, однако неспецифичное праймирование находится в значительно более угнетенном состоянии, чем достигается более эффективная наработка только специфичных ампликонов, которые в дальнейшем являются мишенями для праймеров в системе 100% комплементарности.

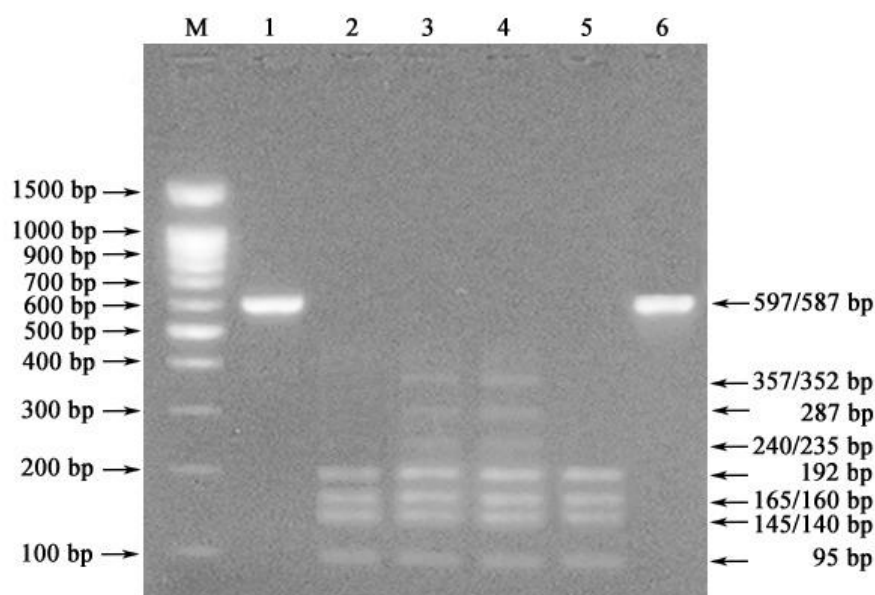
Разработанная нами методика высокоточной ПЦР апробирована на предмет диагностики хламидиозов животных в сравнении с классическим аналогом.

При апробации разработанной нами методики высокоточной ПЦР на предмет диагностики хламидиозов животных установлено, что протестированные модифицированные праймеры Ch1-hs и Ch2-hs, инициирующие амплификацию фрагмента *omp2*-гена хламидий, в градиентной ПЦР с температурой отжига от 55<sup>0</sup>С до 65<sup>0</sup>С показали положительные сигналы амплификации в заданном широком спектре гибридизаций (рис. 2).



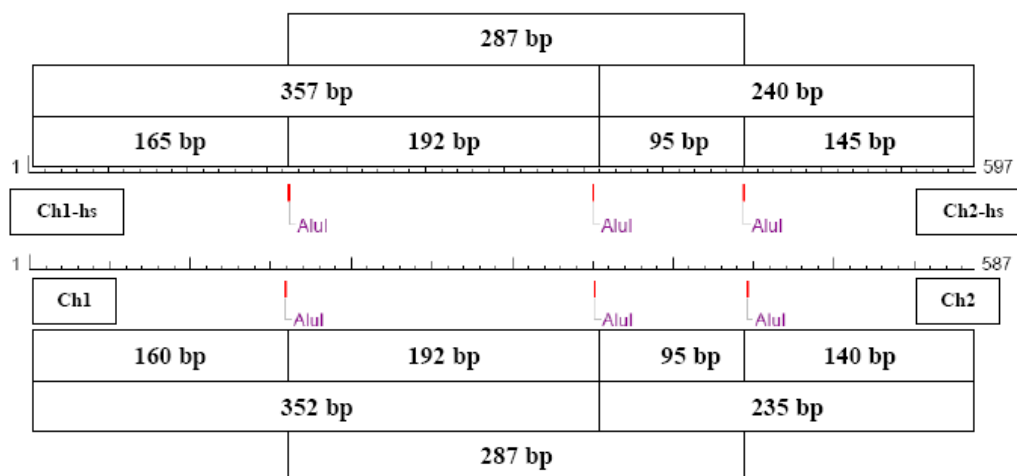
**Рис. 2. Электрофореграмма результата тестирования праймеров Ch1-hs и Ch2-hs в градиентной ПЦР с температурой отжига 55<sup>0</sup>С - 65<sup>0</sup>С**  
**Обозначения:** М) ДНК-маркеры 1500-100 bp (СибЭнзим); 1-9) положительный контроль: ДНК штамма «Ростиново-70»: 1)  $T_a=55,0^0\text{C}$ ; 2)  $T_a=55,9^0\text{C}$ ; 3)  $T_a=57,8^0\text{C}$ ; 4)  $T_a=61,0^0\text{C}$ ; 5)  $T_a=62,4^0\text{C}$ ; 6)  $T_a=63,5^0\text{C}$ ; 7)  $T_a=64,3^0\text{C}$ ; 8)  $T_a=64,8^0\text{C}$ ; 9)  $T_a=65,0^0\text{C}$ .

При сопоставлении внутренней структуры амплифицируемых с праймерами Ch1-hs+Ch2-hs и Ch1+Ch2 фрагментов *omp2*-гена хламидий штамма «Ростиново-70», на основании результатов полного и неполного эндонуклеазного расщепления ферментом *AluI* (рис. 3) с учетом анализа картирования сайтов ее рестрикции (схема 1) определена идентичность наработанных ПЦР-продуктов, что характеризуется тождественной инициацией амплификации выбранной мишени.



**Рис. 3. Электрофореграмма тестирования праймеров Ch1-hs+Ch2-hs и Ch1+Ch2 на предмет сопоставления результата амплификации локуса *omp2*-гена**

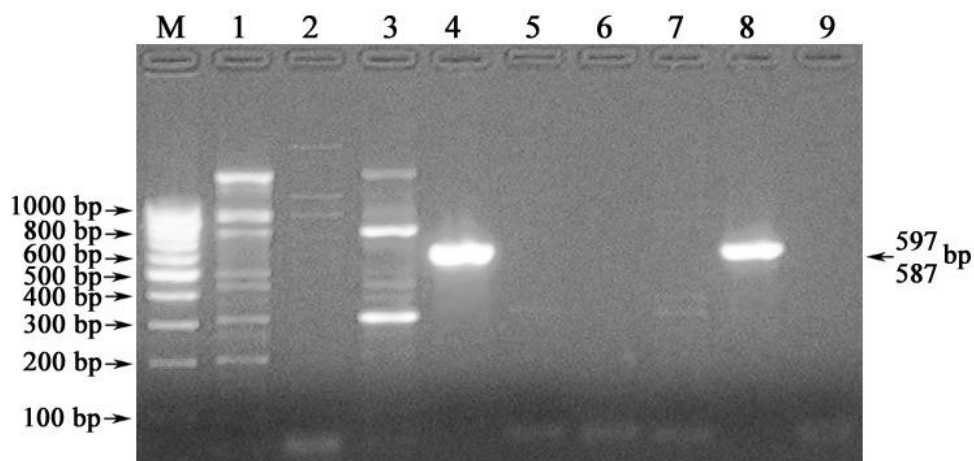
**хламидий, полного и неполного расщепления эндонуклеазой рестрикции *AluI***  
**Обозначения:** М) ДНК-маркеры 1500-100 bp; 1) цельный ПЦР-фрагмент локуса *omp2*-гена хламидий штамма «Ростиново-70», инициированный праймерами Ch1-hs+Ch2-hs (597 bp); 2) *omp2*-ПЦР-ПДРФ-*AluI*-профиль штамма «Ростиново-70» (192, 165, 145, 95 bp, полное расщепление / Ch1-hs+Ch2-hs); 3) *omp2*-ПЦР-ПДРФ-*AluI*-профиль штамма «Ростиново-70» (357, 287, 240, 192, 165, 145, 95 bp, неполное расщепление / Ch1-hs+Ch2-hs); 4) *omp2*-ПЦР-ПДРФ-*AluI*-профиль штамма «Ростиново-70» (352, 287, 235, 192, 160, 140, 95 bp, неполное расщепление / Ch1+Ch2); 5) *omp2*-ПЦР-ПДРФ-*AluI*-профиль штамма «Ростиново-70» (192, 160, 140, 95 bp, полное расщепление / Ch1+Ch2); 6) цельный ПЦР-фрагмент локуса *omp2*-гена хламидий штамма «Ростиново-70», инициированный праймерами Ch1+Ch2 (587 bp).



**Схема 1. Картограмма *omp2*-ПЦР-ПДРФ-*AluI*-профилей**

При исследовании препаратов ДНК, экстрагированных из осадков мочи от 3-х кошек, серонегативных по хламидийной инфекции, нами получен яркий неспецифичный сигнал проб № 1 и № 3 при проведении ПЦР с праймерами Ch1 и Ch2 (J.C. Hartley et al., 2001) в классической постановке: (рис. 4, трек 1, 3).

При проведении ПЦР с модифицированными праймерами Ch1-hs и Ch2-hs в постановке разработанного способа, удалось ликвидировать ход неспецифичной амплификации (рис. 4, трек 5-7).



**Рис. 4. Электрофореграмма результата тестирования способов ПЦР на предмет индикации хламидий**

**Обозначения:**

М) ДНК-маркеры 1000-100 bp (СибЭнзим);

1-4) ПЦР в классической постановке с праймерами Ch1 и Ch2:

1) препарат ДНК, экстрагированный из осадка мочи от кошки № 1;

2) препарат ДНК, экстрагированный из осадка мочи от кошки № 2;

3) препарат ДНК, экстрагированный из осадка мочи от кошки № 3;

4) ДНК *Chlamydomorphila* spp. «Ростиново-70» (положительный контроль).

5-8) ПЦР в постановке предлагаемого способа с праймерами Ch1-hs и Ch2-hs:

5) препарат ДНК, экстрагированный из осадка мочи от кошки № 1;

6) препарат ДНК, экстрагированный из осадка мочи от кошки № 2;

7) препарат ДНК, экстрагированный из осадка мочи от кошки № 3;

8) ДНК *Chlamydomorphila* spp. Ростиново-70 (положительный контроль);

9) dH<sub>2</sub>O (отрицательный контроль).

При тестировании способов ПЦР на предмет индикации хламидий с праймерами Ch1 и Ch2 в классической постановке ( $T_a=55^{\circ}\text{C}$ ), а также праймерами Ch1-hs и Ch2-hs в предлагаемом варианте ( $T_a=60^{\circ}\text{C}$ ), в определенной степени, нами получены прогнозируемые результаты (рис. 4).

Действительно, авторами протокола детекции хламидий с праймерами Ch1 и Ch2 (J.C. Hartley et al., 2001) доказана возможность неспецифичной амплификации нехламидийной ДНК в исследуемых пробах, которую можно избежать при использовании Taq Gold ДНК полимеразы, нежели стандартной Taq ДНК полимеразы.

Таким образом, применение предлагаемого способа проведения ПЦР на предмет индикации хламидий с праймерами Ch1-hs и Ch2-hs позволило устранить неспецифичную амплификацию в исследуемых пробах при использовании в реакции амплификации фермента Taq ДНК полимеразы (рис. 2-4).

По результатам практических исследований, направленных на теоретическое обоснование эффективности предлагаемого способа проведения ПЦР нами получен обеспечиваемый заявленным способом технический результат, выраженный в демонстрации более эффективной наработки специфичных ампликонов с исключением амплификации неспецифичных продуктов реакции.



Разработанный способ проведения ПЦР является изобретением, на которое получено решение РОСПАТЕНТ о выдаче патента РФ (№ 2299240)..

Данная методика высокоточной ПЦР также апробирована на предмет оценки аллельного полиморфизма гена каппа-казеина крупного рогатого скота в сравнении с классической ПЦР и ближайшим аналогом, результаты исследования которых представлены в материалах патента.

### **3.1.3. Разработка способа защиты ОТ-ПЦР от контаминации продуктами амплификации на основе разрушающего действия урацил-ДНК-гликозилазы**

Контаминация – попадание из внешней среды в реакционную смесь специфических и неспецифических молекул ДНК, способных служить мишенями в реакции амплификации и давать ложноположительные или ложноотрицательные результаты (S. Kwok et al., 1989; M.C. Longo et al., 1990).

Таковыми мишенями могут быть продукты реакции, попадающие во внешнюю среду на этапе детекции из пробирок, в которых успешно прошла амплификация, либо специфическая ДНК из образцов на этапе пробоподготовки (S. Kwok et al., 1989; M.C. Longo et al., 1990).

Задачей данного раздела исследования являлась разработка эффективного способа защиты ОТ-ПЦР от контаминации продуктами амплификации на основе урацил-ДНК-гликозилазного метода защиты - действенного инструмента ферментативной деконтаминации, значительно снижающего риск ложноположительных и ложноотрицательных реакций.

Оптимизированные методики с использованием AMV обратной транскриптазы, Tth ДНК полимеразы и *C. therm.* ДНК полимеразы нашли достойное применение в решении данной проблемы, благодаря соответствующим температурным оптимумам данных ферментов, позволяющим использовать урацил ДНК гликозилазный метод защиты от контаминации в варианте «1 пробирка, 1 этап». Использование же M-MuLV обратной транскриптазы совместно с урацил ДНК гликозилазой в варианте «1 пробирка, 1 этап» невозможна по причине одинаковой рабочей температуры.

Нами разработан способ защиты ОТ-ПЦР от контаминации продуктами амплификации на основе разрушающего действия урацил-ДНК-гликозилазы (из *E. coli*) на урацил-содержащую ДНК в варианте «1 пробирка, 2 этапа» при использовании M-MuLV обратной транскриптазы и Taq ДНК полимеразы путем комбинированного использования dTTP/dUTP.

Принцип способа заключается в том, что на 1 этапе M-MuLV обратная транскриптаза катализирует матричный синтез ДНК на матрице РНК с исключением использования урацил-содержащих ампликонов в качестве матрицы из-за их гидролиза урацил-ДНК-гликозилазой (из *E. coli*) при температуре 37<sup>0</sup>С. В качестве строительных блоков используются 4 стандартных дезоксинуклеозидтрифосфатов. На 2 этапе, добавляется в реакционную смесь Taq ДНК полимеразы и смесь из дезоксинуклеозидтрифосфатов с заменой dTTP на dUTP в пропорциональной

концентрации с общим содержанием во время проведения ПЦР 5 дезоксинуклеозидтрифосфатов, что обеспечивает выход урацил-содержащей ДНК (схема 2).

**Схема 2. Способ защиты ОТ-ПЦР от контаминации продуктами амплификации на основе разрушающего действия урацил-ДНК-гликозилазы (из *E. coli*) на урацил-содержащую ДНК в варианте «1 пробирка, 2 этапа» при использовании М-MuLV обратной транскриптазы и Taq ДНК полимеразы путем комбинированного использования dTTP/dUTP**

**ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ**

матрица РНК

A	U	G	C	C	G	U	U	C	C	G	A	G	C	C	U	A	A	G	C	A	U	C	C	G	G	A
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

G	T	A	G	G	C
---	---	---	---	---	---

праймер

ДОБАВЛЯЕТСЯ В РЕАКЦИОННУЮ СМЕСЬ:

М-MuLV обратная транскриптаза

37°C

Смесь из дезоксинуклеозидтрифосфатов (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)

Урацил-ДНК-гликозилаза (из *E. coli*)

dATP
dTTP
dGTP
dCTP

общее  
содержание  
трифосфатов

Отжиг и синтез комплементарной ДНК на матрице РНК

A	U	G	C	C	G	U	U	C	C	G	A	G	C	C	U	A	A	G	C	A	U	C	C	G	G	A
T	A	C	G	G	C	A	A	G	G	C	T	C	G	G	A	T	T	C	G	T	A	G	G	C		

**ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ**

ДОБАВЛЯЕТСЯ В РЕАКЦИОННУЮ СМЕСЬ:

Taq ДНК полимеразы

Смесь из дезоксинуклеозидтрифосфатов с заменой

dTTP на dUTP в пропорциональной концентрации (dATP, dUTP, dGTP, dCTP)

dATP
dTTP
dGTP
dCTP
dUTP

общее  
содержание  
трифосфатов

Денатурация РНК-ДНК комплекса при 94°C

A	U	G	C	C	G	U	U	C	C	G	A	G	C	C	U	A	A	G	C	A	U	C	C	G	G	A
T	A	C	G	G	C	A	A	G	G	C	T	C	G	G	A	T	T	C	G	T	A	G	G	C		

праймер

A	T	G	C	C	G
---	---	---	---	---	---

T	A	C	G	G	C	A	A	G	G	C	T	C	G	G	A	T	T	C	G	T	A	G	G	C
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

комплементарная ДНК, синтезированная с матрицы РНК

Отжиг и синтез урацил-содержащих ампликонов

(вероятность включения dUTP в растущую цепь ДНК составляет приблизительно 50%)

A	T	G	C	C	G	U	T	C	C	G	A	G	C	C	U	A	A	G	C	A	T	C	C	G
T	A	C	G	G	C	A	A	G	G	C	T	C	G	G	A	T	T	C	G	T	A	G	G	C

.....в случае

контаминации ОТ-ПЦР урацил-содержащим ампликоном

урацил-содержащий ампликон

A	T	G	C	C	G	U	T	C	C	G	A	G	C	C	U	A	A	G	C	A	T	C	C	G
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

G	T	A	G	G	C
---	---	---	---	---	---

праймер

М-MuLV обратная транскриптаза

37°C

Урацил-ДНК-гликозилаза

dATP
dTTP
dGTP
dCTP

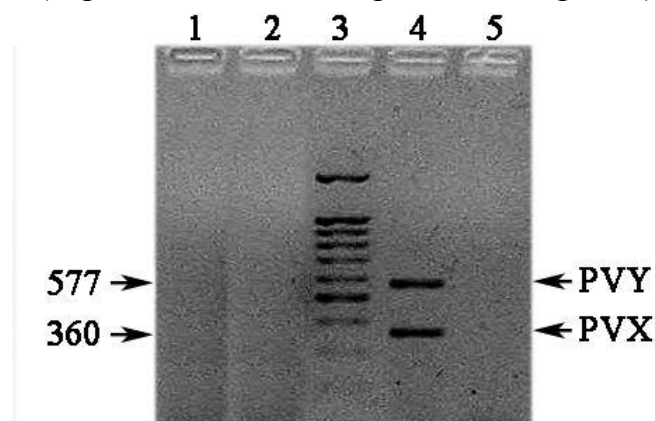
общее  
содержание  
трифосфатов

Высвобождение свободного урацила из урацил-содержащей ДНК

и лишение контаминанта роли мишени

A	T	G	C	C	G		T	C	C	G	A	G	C	C		A	A	G	C	A	T	C	C	G
T	A	C	G	G	C		T	C	C	G	A	G	C	C		T	T	C	G	T	A	G	G	C

Для теоретического обоснования разработанного способа нами были проведены практические исследования, направленные на доказательство эффективности выбранного подхода, для чего проводили мультиплексную ОТ-ПЦР для одновременного выявления возбудителей вирусных болезней картофеля в варианте «1 пробирка, 2 этапа» с использованием в качестве ПКО (положительный контрольный образец) положительную на PVY (Potato virus Y)+PVX (Potato virus X) амплифицированную ОТ-ПЦР-пробу в разведении  $1:10^6$  в смеси с ОКО (отрицательный контрольный образец).



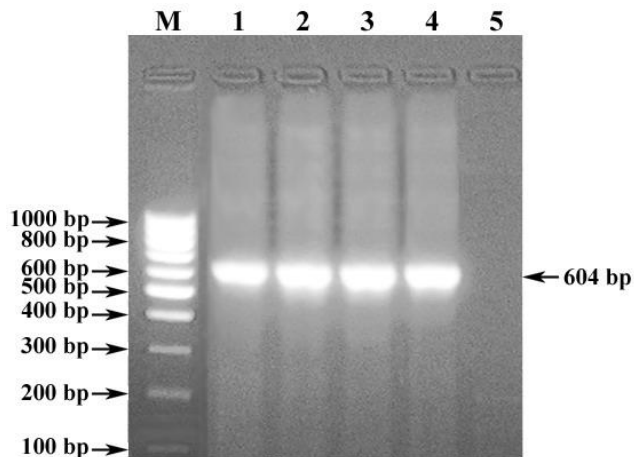
**Рис. 5. Электрофореграмма результата разрушающего действия урацил-ДНК- гликозилазы (из *E. coli*) на урацил-содержащую ДНК**

**Обозначения:**

- 1-2) Реамплификация урацил-содержащих ампликонов [ПКО (PVY+PVX)] с урацил-ДНК-гликозилазой (технический результат – предотвращение возможности реамплификации урацил-содержащих ампликонов).
- 3) ДНК маркеры.
- 4) Реамплификация урацил-содержащих ампликонов [ПКО (PVY+PVX)] без урацил-ДНК-гликозилазы (технический результат – успешная реамплификация урацил-содержащих ампликонов).
- 5) ОКО [сорт картофеля «Адретта»].

По результатам практических исследований нами получен обеспечиваемый заявленным способом технический результат, выраженный в демонстрации предотвращения возможности реамплификации урацил-содержащих ампликонов в виду того, что урацил-содержащая ДНК (контаминант) теряет роль мишени из-за выщепления из нее свободного урацила ферментом урацил-ДНК-гликозилазой (из *E. coli*) в процессе реакции.

Представленный способ защиты ОТ-ПЦР от контаминации продуктами амплификации также апробирован в системе проведения ОТ-ПЦР при индикации хламидий по *23S rPHK* с праймерами U23F и 23SIGR (рис. 6) в альтернативной стратегии амплификации (K.D. Everett et al., 1999b).



**Рис. 6. Электрофореграмма результата ОТ-ПЦР для индикации хламидий по 23S *rRNA* с праймерами U23F и 23SIGR**

**Обозначения:** М) ДНК-маркеры 1000-100 bp (СибЭнзим);

- 1) *Chlamydophila* spp. «Ростиново-70»;
- 2) *Chlamydophila* spp. «250»;
- 3) *Chlamydophila* spp. «ПП-87»;
- 4) *Chlamydophila* spp. «КС-93»;
- 5) H<sub>2</sub>O.

Разработанный способ защиты ОТ-ПЦР от контаминации продуктами амплификации на основе разрушающего действия урацил-ДНК-гликозилазы является изобретением, на которое получено решение РОСПАТЕНТ о выдаче патента РФ (№ 2307167).

### **3.2. Результаты исследования плотоядных животных на хламидиоз**

#### **3.2.1. Оценка эпизоотического состояния зверосовхоза «Вятский» Кировской области РФ в отношении хламидиоза пушных зверей**

Изучение эпизоотического состояния неблагополучного зверохозяйства проводилось за 3 года (1999-2001 гг.).

По данным документов и информации главного ветеринарного врача зверосовхоза известно, что в хозяйстве у лисиц регистрировались: заболевания мочеполовой сферы у самцов и самок; аборт, мертворождения и рождения слабого нежизнеспособного молодняка, а также конъюнктивиты и атипичное течение заболеваний органов дыхания и пищеварения; поражения суставов невыясненной этиологии; высокий процент дорегистрационной и после регистрационной гибели щенков лисиц, что является характерным и для хламидийной инфекции. Областная ветеринарная лаборатория исключает бактериальные и вирусные инфекции (бруцеллез, лептоспироз, листериоз, сальмонеллез, стрептококкоз, вирусный гепатит плотоядных и т.п.). Токсикологические исследования кормов в областной лаборатории дали отрицательные результаты.

В 1999 году процент абортировавших и бесплодных лисиц в зверохозяйстве составил соответственно 3 и 6. В 2000 г. наблюдался рост в стаде доли абортировавших (до 6%) и бесплодных (до 11%) самок. С этого же

года произошло увеличение процента мертворожденных и павших до регистрации щенков до 8 и 15, соответственно. В 2001 году произошло снижение анализируемых показателей, что вероятно связано с тем, что с декабря 2000 года по нашим рекомендациям с целью профилактики хламидиозов в рацион зверям стали добавлять кормовые антибиотики тетрациклинового ряда («Биовит-80 и 120»), перед гоним двукратно с интервалом 1 месяц в дозах, согласно инструкциям по применению указанных препаратов.

В апреле 2000 года из зверосовхоза «Вятский» Кировской области РФ к нам поступил патологический материал: органы абортировавших и «неблагополучно» оценившихся лисиц, абортированные плоды и щенки, павшие до регистрации, а также сыворотки крови абортировавших лисиц из зверосовхоза «Вятский» Кировской области РФ. Для подтверждения предположений о хламидийной природе вышеописанных патологических явлений у лисиц были проведены лабораторные (бактериологические, серологические и молекулярно-генетические) исследования.

Хламидии были выделены в первом же пассаже из патологического материала, полученного из неблагополучного хозяйства, на развивающихся куриных эмбрионах. Специфическая гибель КЭ в первом пассаже наступала на 8-12 сутки после заражения. При вскрытии павших эмбрионов отмечали множественные точечные кровоизлияния в области головы и конечностей, а также гиперемию и отек желточного мешка и хорионаллантоисной оболочки. В мазках-отпечатках, приготовленных из оболочек желточных мешков погибших куриных эмбрионов, обнаруживали характерные фиолетово-красные элементарные тельца хламидий на зеленовато-синем фоне препарата. Окрашивание проводили по модифицированному методу Стемпа.

При испытании 12 проб сывороток крови, полученных от абортировавших лисиц из зверосовхоза «Вятский» Кировской области РФ, в РСК положительно реагировали (титр хламидийных антител 1:10 и выше) 4 пробы, сомнительно (титр хламидийных антител 1:5) – 4 пробы.

Эти же сыворотки параллельно были исследованы в ИФА на предмет выявления специфических антител. 4 пробы сыворотки, положительно реагирующие в РСК, имели титр хламидийных антител в ИФА 1:200 – 1:1600; 4 пробы сыворотки, сомнительно реагирующие в РСК, имели титр хламидийных антител в ИФА 1:100-1:400. Из 4 проб сывороток, не реагирующих в РСК, в 3 случаях в ИФА были выявлены специфические хламидийные антитела в титрах 1:100-1:400. Одна проба сыворотки не реагировала ни в РСК, ни в ИФА.

Таким образом, на основании выделения возбудителя и положительных результатов серологических исследований сывороток крови абортировавших лисиц, в зверосовхозе «Вятский» Кировской области РФ ими установлен хламидиоз лисиц.

Для подтверждения вышеописанных данных нами были проведены молекулярно-генетические исследования патологического материала. Эти исследования описаны ниже.

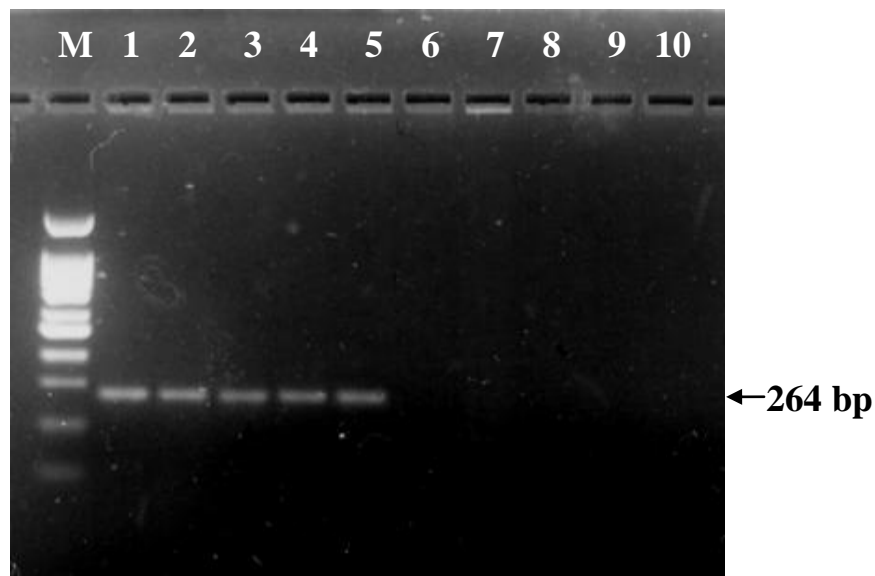
В результате ПЦР диагностики доказана этиологическая роль хламидийной инфекции у лисиц зверосовхоза «Вятский» Кировской области РФ, приводившая к абортam, мертворождениям и рождением слабого нежизнеспособного молодняка.

### 3.2.2. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) со специфичными праймерами для индикации хламидий

ПЦР проводили с использованием специфичных исключительно для вида *Chlamydia psittaci* (согласно новой классификации хламидий, предложенной K.D. Everett et al. (1999b), – для видов *Chlamydophila psittaci*, *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila felis* и *Chlamydophila caviae*), олигонуклеотидных праймеров, сконструированных R. Glyn Hewinson et al. (1997).

Разработанный ПЦР-тест основан на амплификации фрагмента ДНК хламидий длиной 264 пар нуклеотидов, который включает в себя 5'-не транслируемый регион и часть гена *Chlamydia psittaci*, кодирующего синтез основного белка наружной мембраны возбудителя.

Результатом ПЦР со специфичными праймерами CPF и CPR проб ДНК штаммов хламидий «КС-93», «ПП-87», «250», «Ростиново-70», «БЛ-84» явилась амплификация специфичного фрагмента ДНК хламидий длиной 264 bp (рис. 7).



**Рис. 7. Электрофореграмма продуктов ПЦР со специфичными праймерами CPF и CPR для индикации хламидий**

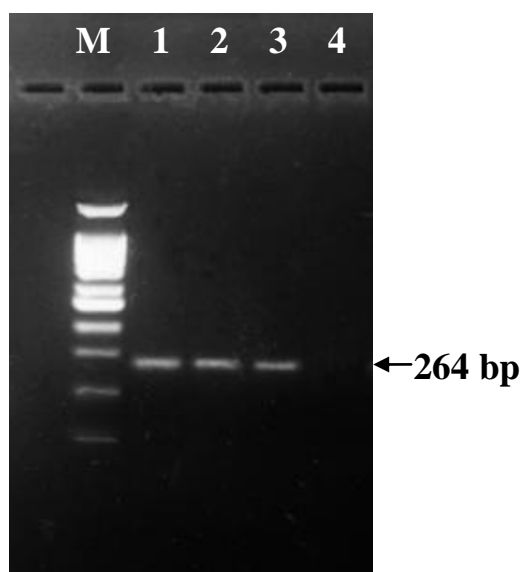
**Обозначения:** М) ДНК маркеры; 1) ДНК хламидий штамма «КС-93»; 2) ДНК хламидий штамма «ПП-87»; 3) ДНК хламидий штамма «250»; 4) ДНК хламидий штамма «Ростиново-70»; 5) ДНК хламидий штамма «БЛ-84»; 6) ДНК неинфицированных хламидиями ЖОКЭ; 7) ДНК *Chlamydia trachomatis* штамма «L2»; 8) ДНК *Brucella abortus* штамма «82»; 9) ДНК *Salmonella typhimurium* штамма «371»; 10) ДНК *Listeria monocytogenes* штамма «АУФ».

Данный фрагмент отсутствовал при проведении ПЦР с ДНК, выделенной от других микроорганизмов (хламидий вида *Chlamydia trachomatis*, бруцелл, сальмонелл и листерий), а также ДНК ЖОКЭ, неинфицированных хламидиями.

Полученные результаты дают основания считать, что ПЦР со специфичными праймерами CPF и CPR является эффективным средством индикации ряда возбудителей хламидийных инфекций животных.

Следующим этапом наших исследований было определение чувствительности ПЦР-теста с праймерами CPF и CPR.

Исходя из расчета, что 10 fg хламидийной ДНК эквивалентно одной геномной копии (R. Glyn Hewinson et al., 1997), нами были приготовлены серийные разведения ДНК хламидий штамма «250» (240 fg, 120 fg, 60 fg и 30 fg в пробе, что эквивалентно 24, 12, 6 и 3 геномным копиям хламидий, соответственно). Результаты этих исследований представлены на рис. 8.



**Рис. 8. Определение чувствительности ПЦР со специфичными праймерами CPF и CPR для индикации хламидий**

**Обозначения:**

М) ДНК маркеры;

1-4) Серийные разведения ДНК хламидий штамма «250»:

1) 240 fg в пробе; 2) 120 fg в пробе; 3) 60 fg в пробе; 4) 30 fg в пробе.

Анализируя электрофореграмму полученных ампликонов, можно констатировать, что чувствительность ПЦР с очищенной ДНК хламидий составляет  $\geq 60$  fg ДНК или 6 геномных копий хламидий в пробе.

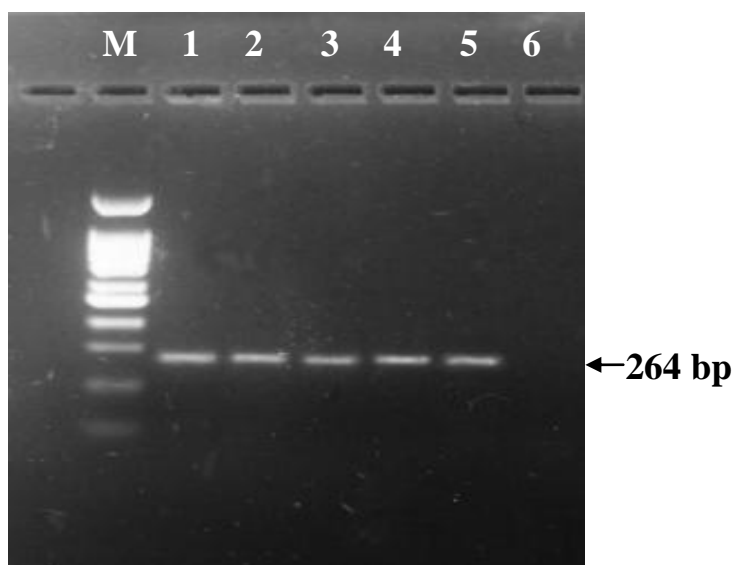
### **3.2.2.1. Выявление возбудителя хламидиоза в патологическом материале при помощи ПЦР со специфичными праймерами**

Следующим этапом наших исследований явилось выявление возбудителей хламидиоза в патологическом материале, используя технику ПЦР.

С этой целью нами методом ПЦР со специфичными праймерами CPF+CPR на предмет выявления хламидий был исследован патологический материал:

- поступивший из зверосовхоза «Вятский» Кировской области РФ;
- полученный от собак и кошек, подозрительных по заболеванию хламидиозом.

Результаты этих опытов представлены на рис. 9.



**Рис. 9. ПЦР-индикация хламидий в патологическом материале (праймеры CPF и CPR)**

**Обозначения:** М) ДНК маркеры; 1) ДНК хламидий штамма «БЛ-84» (положительный контроль); 2) матка абортировавшей собаки; 3) матка «неблагополучно» ощенившейся лисицы; 4) соскоб с конъюнктивы кошки; 5) органы щенка собаки, павшего на 3-й день после рождения; 6) отрицательный контроль.

Из рис. 9 видно, что исследованные в ПЦР пробы патологического материала образовали специфичные для хламидий ампликоны длиной 264 bp.

Таким образом, проведенные исследования подтвердили возможность ПЦР-индикации возбудителей хламидиоза в патологическом материале с применением искусственно синтезированных олигонуклеотидных праймеров CPF и CPR.

### **3.3. Результаты лабораторных исследований рептилий, амфибий и декоративных птиц на хламидиоз**

В результате проведенных исследований методом РИФ специфическое свечение хламидийного антигена обнаружили у 7 (35%) из 20 исследованных рептилий. Хламидии были обнаружены: у средиземноморской черепахи (самец, 15 лет, клинически здоров); среднеазиатской черепахи (самка, 7 лет, периодическая диарея и конъюнктивит); еще одной среднеазиатской черепахи (самка, 5 лет, диарея и конъюнктивит); европейской болотной черепахи (самец, 10 лет, влажный некроз хвоста); красноухой черепахи (самка, 7 лет, конъюнктивит и влажный некроз пальцев); еще одной красноухой черепахи (самка, 10 лет, клинически здорова); синезычного сцинка (самец, 4 года, клинически здоров).

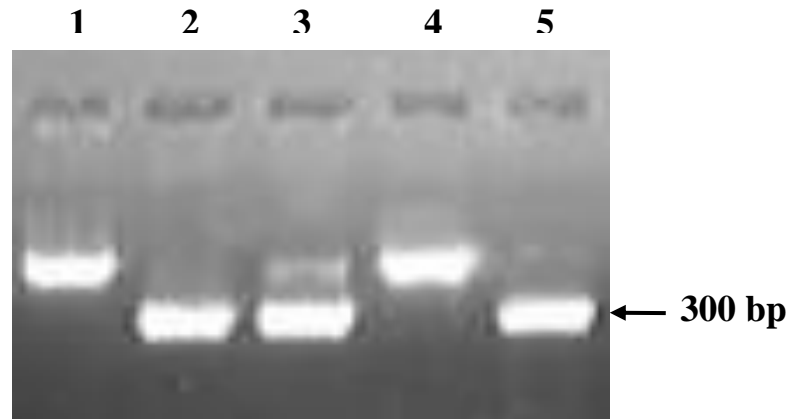
При исследовании в РИФ земноводных, обитающих в некоторых естественных водоемах РТ, специфическое свечение хламидийного антигена было обнаружено в клиническом материале, полученном от 54 лягушек, в т.ч. от особей, отловленных в прудах п. Столбищи и с. Тат. Саралы, а также озере на территории Раифского монастыря. У лягушек, отловленных в озере недалеко от химкомбината ЗАО «Оргсинтез», хламидийный антиген не был выявлен.



Световой микроскопией мазков-отпечатков морфологические структуры хламидий были обнаружены только в 18 случаях; все они были получены от животных, которые входили в число тех 61 рептилий и амфибий, у которых в РИФ был обнаружен антиген хламидий. Полученные данные подтверждают мнение исследователей о низком проценте выявления хламидий при световой микроскопии.

При скрининговых исследованиях сывороток крови рептилий, амфибий и декоративных птиц в РСК комплементсвязывающие антитела были обнаружены соответственно в 15, 8 и 18% исследованных проб.

При исследовании в ПЦР 20 проб клинического материала, полученного от животных позитивных по хламидиозу в РИФ, ДНК хламидий были обнаружены в 12 случаях. Результатом ПЦР (тест-система «ХЛА-КОМ») клинического материала, полученного от рептилий и амфибий явилась амплификация фрагмента ДНК хламидий длиной 300 пар нуклеотидов (рис. 10).



**Рис. 10. Электрофореграмма результатов ПЦР с клиническим материалом, полученным от хладнокровных животных (тест-система «ХЛА-КОМ»)**

**Обозначения:**

- 1) отрицательный контрольный образец;
- 2) положительная контрольная ДНК (ДНК *Chl. psittaci*);
- 3) исследуемая проба от черепахи (положительный результат);
- 4) исследуемая проба от черепахи (отрицательный результат);
- 5) исследуемая проба от лягушки (положительный результат).

Проведенными исследованиями продемонстрирована возможность ПЦР-индикации возбудителей хламидиоза в клиническом материале, полученном от рептилий и амфибий с использованием тест-системы «ХЛА-КОМ».

Лабораторными методами нами были выявлены несколько случаев хламидиоза у декоративных птиц.

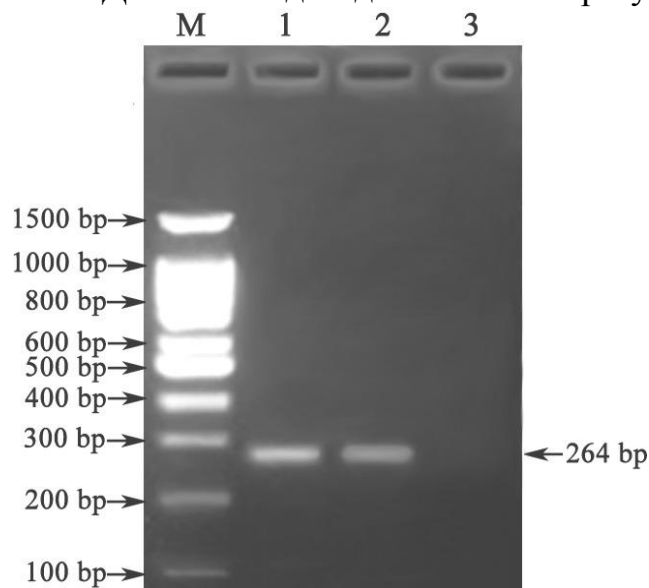
В первом случае поступил волнистый попугай, у него воспалились глаза, сначала один, затем другой. У попугая были взяты мазок-отпечаток с конъюнктивы глаза и кровь для получения сыворотки. Во втором случае обратился владелец канарейки. За три месяца до визита к нам у нее появился конъюнктивит. Характерным было то, что конъюнктивит был односторонний и очень вяло развивался. У канарейки также были взяты мазок-отпечаток с конъюнктивы глаза и кровь для получения сыворотки. Люминесцентным

методом у обеих птиц в клиническом материале было выявлено специфическое свечение хламидийного антигена, в сыворотке крови попугая и канарейки были обнаружены специфические противохламидийные антитела в диагностических титрах.

В следующем случае поступил декоративный голубь. У него регистрировалось заболевание, которое характеризовалось поражением верхних дыхательных путей и конъюнктивитом. У голубя был взят мазок-отпечаток с конъюнктивы глаза. Люминесцентным методом в клиническом материале было выявлено специфическое свечение хламидийного антигена.

В феврале 2006 г. к нам поступил домашний индюк. За неделю до этого у него появились признаки поражения органов дыхания. При клиническом осмотре было установлено, что индюк сильно истощен, у него регистрировались: односторонние катаральные синусит и ринит, а также односторонний же гнойный конъюнктивит. У индюка был взят мазок-отпечаток с конъюнктивы глаза. Люминесцентным методом в клиническом материале было выявлено специфическое свечение хламидийного антигена.

Клинический материал от одного из попугаев был подвергнут молекулярно-генетическим исследованиям. Результатом ПЦР клинического материала со специфичными праймерами CPF и CPR явилась амплификация специфичного фрагмента ДНК хламидий длиной 264 пар нуклеотидов (рис. 11).



**Рис. 11. Электрофореграмма результатов ПЦР с клиническим материалом, полученным от попугая (праймеры CPF и CPR)**

**Обозначения:**

- М) ДНК-маркеры;
- 1) положительный контроль (ДНК хламидий);
- 2) исследуемая проба;
- 3) отрицательный контроль.(H<sub>2</sub>O).

Таким образом, подтверждена возможность ПЦР-индикации возбудителей хламидиоза в клиническом материале, полученном от декоративной птицы с применением искусственно синтезированных олигонуклеотидных праймеров CPF и CPR.

### 3.4. Молекулярно-генетический анализ хламидий

Задачей данного раздела исследования являлись молекулярно-генетические исследования типичных представителей рода *Chlamydophila* из коллекции микроорганизмов ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» на предмет их таксономической принадлежности, на основании сравнительного анализа по *omp1*-, *omp2*-, *16S rPHK*- и *23S rPHK*-генам с соответствующими фрагментами геномов официально зарегистрированных видов хламидий, а также наличие экстрахромосомной плазмиды.

Нами установлено, что штаммы хламидий «Ростиново-70», «250», «ПП-87» и «КС-93» являются типичными представителями рода *Chlamydophila* и по характеру клинических проявлений схожи с видом *Chlamydophila abortus*. Однако, результаты ПЦР изучаемых штаммов хламидий, анализа ПДРФ и секвенирования продуктов ПЦР-амплификации показали отличия, позволяющие дифференцировать их от других представителей семейства *Chlamydiaceae*.

#### 3.4.1. Сравнительная характеристика хламидий по *omp1*-гену

После проведения ПЦР, используя праймеры 5GPF и 3GPB, с экстрактами ДНК очищенных штаммов хламидий «Ростиново-70», «250», «ПП-87» и «КС-93», у всех 4 штаммов были зарегистрированы одинаковые результаты в виде одного цельного ампликона локуса *omp1*-гена длиной 1378 бп (рис. 12).

При последующем эндонуклеазном расщеплении ферментом *HaeIII* амплифицированного локуса *omp1*-гена были получены 2 дискретных фрагмента длиной 1070 бп и 308 бп (рис. 12).

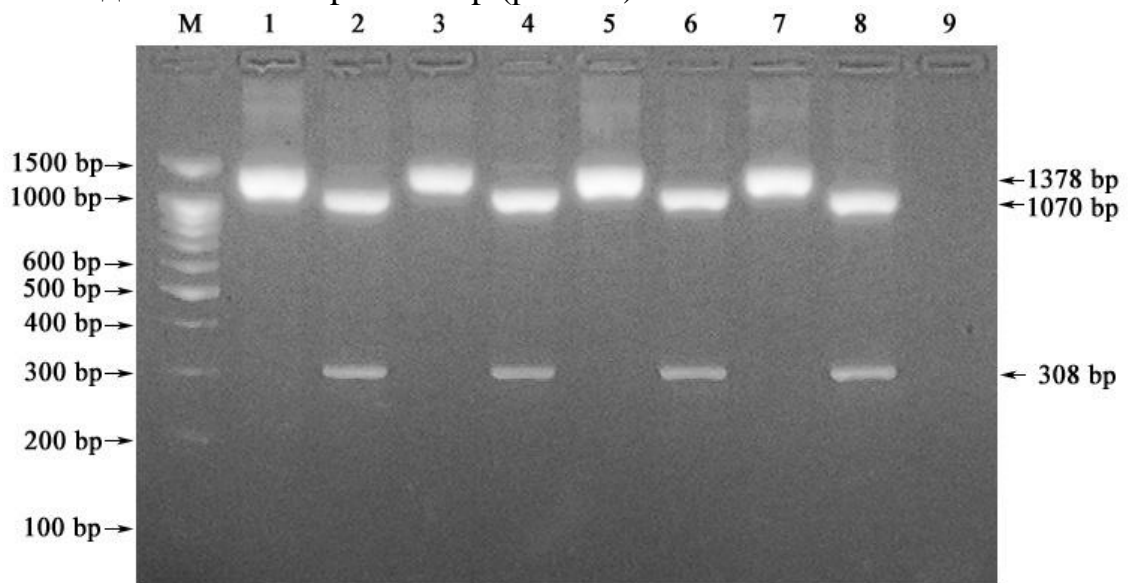
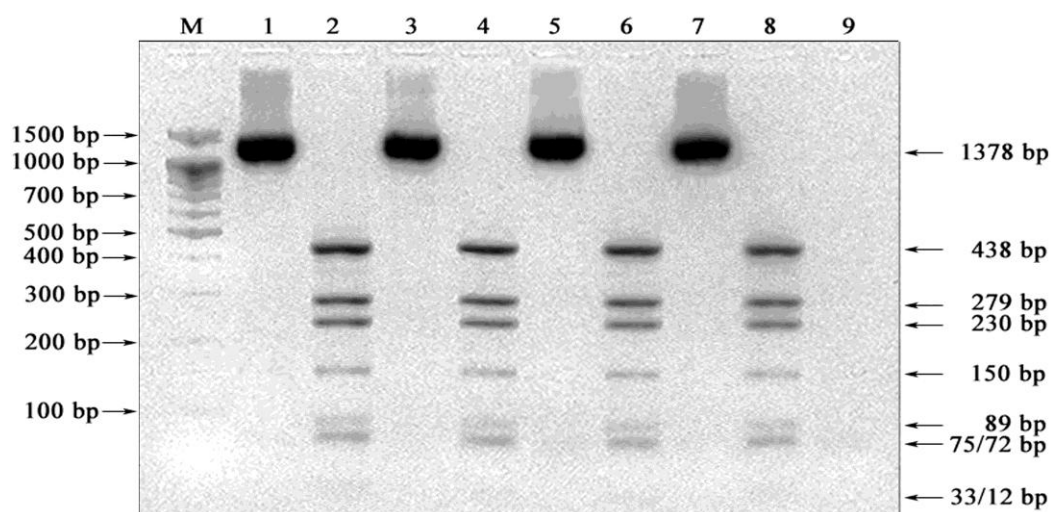


Рис. 12. *Omp1*-ПЦР-ПДРФ-*HaeIII*-профиль штаммов хламидий из коллекции микроорганизмов ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»

Обозначения: М) ДНК маркеры; 1) «Ростиново-70»; 2) «Ростиново-70» (*HaeIII*); 3) «250»; 4) «250» (*HaeIII*); 5) «ПП-87»; 6) «ПП-87» (*HaeIII*); 7) «КС-93»; 8) «КС-93» (*HaeIII*); 9) H<sub>2</sub>O.

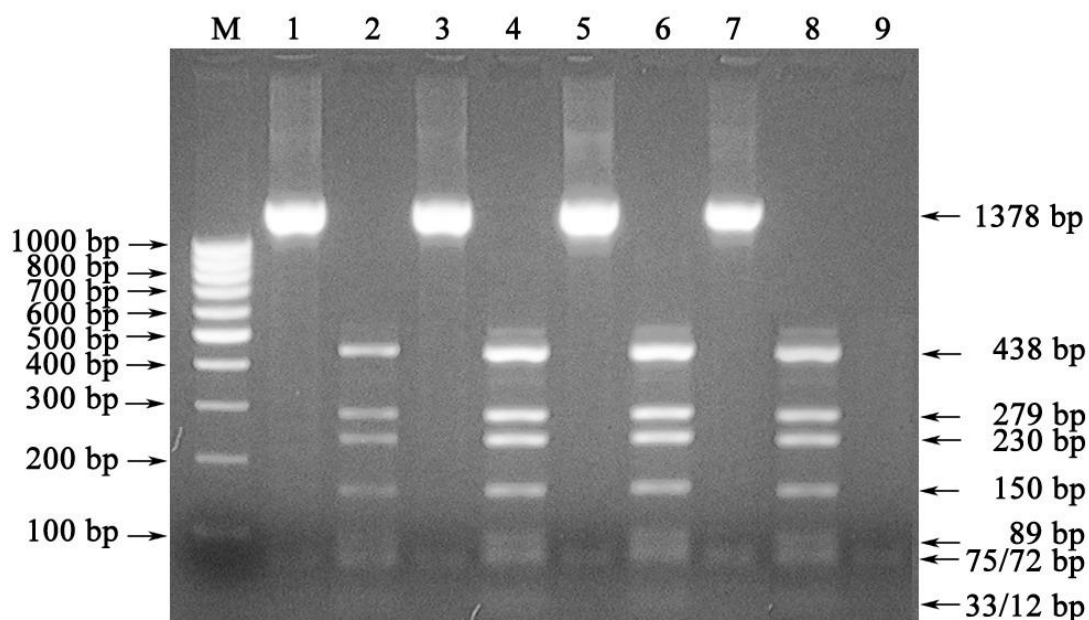
При эндонуклеазном расщеплении ферментом *AluI* амплифицированного локуса *omp1*-гена исследованных штаммов хламидий были получены фрагменты длиной 438, 279, 230, 150, 89, 75, 72, 33 и 12 bp (рис. 13).



**Рис. 13. *Omp1*-ПЦР-ПДРФ-*AluI*-профиль штаммов хламидий из коллекции микроорганизмов ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»**

**Обозначения:** М) ДНК маркеры; 1) «Ростиново-70»; 2) «Ростиново-70» (*AluI*); 3) «250»; 4) «250» (*AluI*); 5) «ПП-87»; 6) «ПП-87» (*AluI*); 7) «КС-93»; 8) «КС-93» (*AluI*); 9) H<sub>2</sub>O.

Аналогичные результаты были получены также при проведении ПЦР-ПДРФ с неочищенными культурами исследованных штаммов хламидий (рис. 14).



**Рис. 14. *Omp1*-ПЦР-ПДРФ-*AluI*-профиль штаммов хламидий из коллекции микроорганизмов ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (неочищенные культуры)**

**Обозначения:** М) ДНК маркеры; 1) «Ростиново-70»; 2) «Ростиново-70» (*AluI*); 3) «250»; 4) «250» (*AluI*); 5) «ПП-87»; 6) «ПП-87» (*AluI*); 7) «КС-93»; 8) «КС-93» (*AluI*); 9) H<sub>2</sub>O.

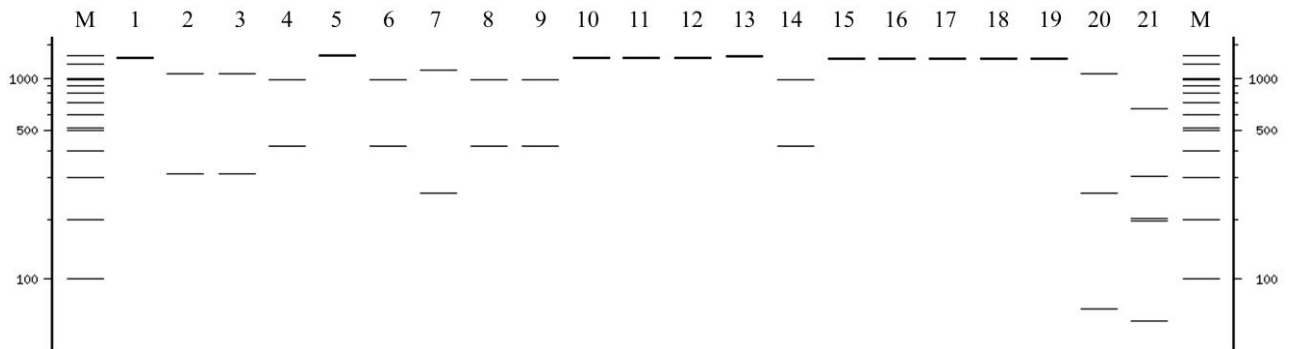
Штамм «Ростиново-70» был выравнен по длине 881 н. локуса *omp1*-гена (DQ177459, 1-881 н.) с соответствующими опубликованными в GenBank NCBI нуклеотидными последовательностями штаммов микроорганизмов семейства *Chlamydiaceae*, используя программы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) и CLUSTAL W (v. 1.83) Multiple Sequence Alignments (<http://align.genome.jp/>). При построении филограммы при анализе *omp1*-гена представителей семейства *Chlamydiaceae* использовали алгоритм NJ.

Секвенированные последовательности частичного *omp1*-гена штаммов «Ростиново-70», «250», «ПП-87» и «КС-93» имели между собой 100% гомологию и были на 99% идентичны со штаммами «GD», «СТ1» и «Par1». Следует отметить, что *omp1*-гетерогенность данных штаммов по отношению к штамму «6BC» *Chlamydophila psittaci* составляет 21%, а по отношению к штамму «S26/3» *Chlamydophila abortus* – 14%.

По результатам филогенетического анализа *omp1*-гена хламидий выявлено, что исследуемые штаммы «Ростиново-70», «250», «ПП-87» и «КС-93» когерентны к так называемым «промежуточным» штаммам хламидий *Chlamydophila psittaci*.

Для упорядочивания генотипов исследуемых штаммов хламидий нами были дополнительно проанализированы результаты выравнивания и *AluI* / *HaeIII* рестрикционного картирования амплифицируемых при помощи праймеров 5GPF и 3GPB нуклеотидных последовательностей ДНК локуса *omp1*-гена ряда референтных штаммов *Chlamydophila psittaci*, *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila caviae* и *Chlamydophila felis*, данные которых использованы при моделировании *Omp1*-ПЦР-ПДРФ-*HaeIII* и *Omp1*-ПЦР-ПДРФ-*AluI*-профилей хламидий (рис. 15-16).

На основании результатов выравнивания и рестрикционного картирования амплифицируемых нуклеотидных последовательностей ДНК локуса *omp1*-гена ряда референтных штаммов *Chlamydophila psittaci*, *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila caviae* и *Chlamydophila felis*, данные которых использованы и при моделировании *Omp1*-ПЦР-ПДРФ-профилей, можно сделать утвердительное заключение, что по *omp1*-ПДРФ-*HaeIII*-профилю штаммы «Ростиново-70», «250», «ПП-87» и «КС-93», а также «GD», «СТ1» и «Par1» можно объединить в одну группу (рис. 15). Однако, согласно *omp1*-ПДРФ-*AluI*-профилю штаммы «Ростиново-70», «250», «ПП-87» и «КС-93» характеризуются признаком нового, ранее не изученного генотипа хламидий, названного нами «генотип G» (рис. 16).



**Рис. 15. *Omp1*-ПЦР-ПДРФ-*HaeIII*-профиль хламидий рода *Chlamydomphila* (праймеры 5GPF и 3GPB)**

**Обозначения:**

М – ДНК-маркеры.

1) *Chlamydomphila* sp. Rostinovo-70 (цельный ПЦР фрагмент длиной 1378 bp).

2) *Chlamydomphila* sp. Rostinovo-70 (1070/308 bp);

гомологичные штаммы: 250; ПП-87, КС-93.

3) *Chlamydomphila psittaci* GD (1070/308 bp);

гомологичные штаммы: CT1, Par1.

4) *Chlamydomphila psittaci* 6BC (987/424 bp);

гомологичные штаммы: GV, 90/1051, MNZang.

5) *Chlamydomphila psittaci* 84-55 (1414 bp).

6) *Chlamydomphila psittaci* CP3 (987/424 bp);

гомологичные штаммы: 41A12.

7) *Chlamydomphila psittaci* NJ (1124/257 bp);

гомологичные штаммы: 92-1293, TT3, 7344/2.

8) *Chlamydomphila psittaci* MN\_VR122 (987/424 bp);

гомологичные штаммы: A22/M, MNRh, MNOs, 3759/2.

9) *Chlamydomphila psittaci* N352 (987/424 bp);

гомологичные штаммы: 98AV2129, WS/RT/E30.

10) *Chlamydomphila psittaci* VS225 (1378 bp);

гомологичные штаммы: 7778B15.

11) *Chlamydomphila psittaci* 82/2334 (1378 bp).

12) *Chlamydomphila psittaci* R54 (1375 bp).

13) *Chlamydomphila psittaci* WC (1393 bp).

14) *Chlamydomphila psittaci* M56 (987/424 bp).

15) *Chlamydomphila abortus* S26/3 (1372 bp);

гомологичные штаммы: LW508, OCLH\_196, EBA, B577, BA1.

16) *Chlamydomphila abortus* LLG (1372 bp).

17) *Chlamydomphila abortus* pmSH1 (1372 bp).

18) *Chlamydomphila abortus* pm364 (1372 bp);

гомологичные штаммы: pm112, pmd623, pm225.

19) *Chlamydomphila abortus* pm326 (1372 bp);

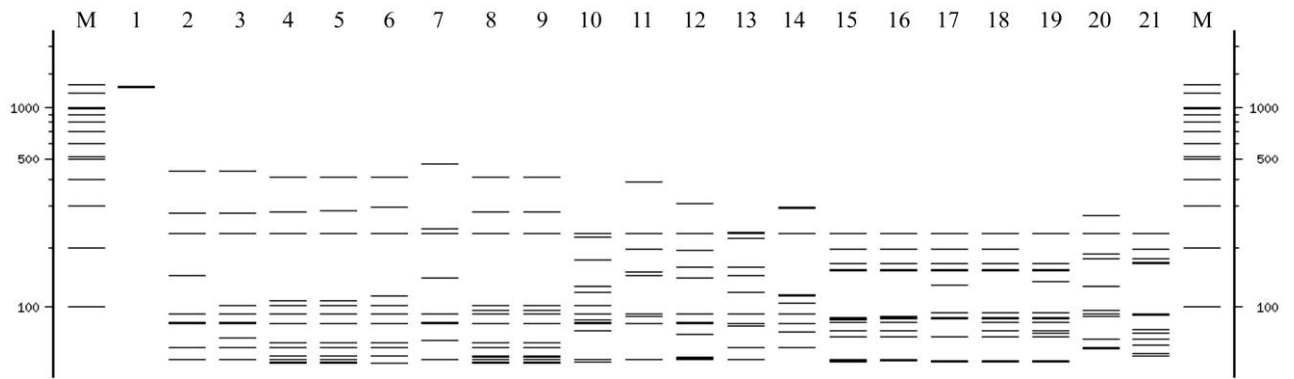
гомологичные штаммы: pm234.

20) *Chlamydomphila felis* FP Pring (1073/257/51 bp);

гомологичные штаммы: FP FEPN, FP Baker, FP Cello.

21) *Chlamydomphila caviae* GPIC (642/302/201/197/30 bp);

гомологичные штаммы: isolate GPIC.



**Рис. 16. *Omp1*-ПЦР-ПДРФ-*AluI*-профиль хламидий рода *Chlamydomphila* (праймеры 5GPF и 3GPB)**

**Обозначения:**

М – ДНК-маркеры.

1) *Chlamydomphila* sp. Rostinovo-70 (цельный ПЦР фрагмент длиной 1378 bp).

2) *Chlamydomphila* sp. Rostinovo-70 (438/279/230/150/89/75/72/33/12 bp);

генотип G; гомологичные штаммы: 250; ПП-87, КС-93.

3) *Chlamydomphila psittaci* GD (438/279/230/101/89/75/72/49/33/12 bp);

генотип С; гомологичные штаммы: СТ1, Par1.

4) *Chlamydomphila psittaci* 6BC (411/282/230/110/102/89/72/41/33/18/12/7/4 bp);

генотип А; гомологичные штаммы: GV, 90/1051, MNZang.

5) *Chlamydomphila psittaci* 84-55 (411/285/230/110/102/89/72/41/33/18/12/7/4 bp);

генотип А.

6) *Chlamydomphila psittaci* CP3 (411/294/230/117/102/89/72/41/33/18/4 bp);

генотип В; гомологичные штаммы: 41A12.

7) *Chlamydomphila psittaci* NJ (471/240/230/147/89/75/72/45/12 bp);

генотип D; гомологичные штаммы: 92-1293, TT3, 7344/2.

8) *Chlamydomphila psittaci* MN\_VR122 (411/282/230/102/94/89/72/41/33/18/16/12/7/4 bp);

генотип Е; гомологичные штаммы: A22/M, MNRh, MNOs, 3759/2.

9) *Chlamydomphila psittaci* N352 (411/282/230/102/94/89/72/41/33/18/16/12/7/4 bp);

генотип E/B; гомологичные штаммы: 98AV2129, WS/RT/E30.

10) *Chlamydomphila psittaci* VS225 (230/222/177/132/123/102/89/78/75/72/60/12/6 bp);

генотип F; гомологичные штаммы: 7778B15.

11) *Chlamydomphila psittaci* 82/2334 (387/230/198/156/150/89/84/72/12 bp).

12) *Chlamydomphila psittaci* R54 (306/230/195/165/147/89/75/72/54/15/15/12 bp).

13) *Chlamydomphila psittaci* WC (231/230/219/165/150/123/89/72/69/33/12 bp).

14) *Chlamydomphila psittaci* M56 (294/291/230/120/117/106/89/72/59/33 bp).

15) *Chlamydomphila abortus* S26/3 (230/198/171/161/159/82/81/78/75/60/51/12/8/6 bp);

гомологичные штаммы: LW508, OCLH\_196, EBA, B577, BA1.

16) *Chlamydomphila abortus* LLG (230/198/171/161/159/84/82/81/75/60/51/12/8 bp).

17) *Chlamydomphila abortus* pmSH1 (230/198/171/161/159/135/90/82/81/51/8/6 bp).

18) *Chlamydomphila abortus* pm364 (230/198/171/161/159/90/82/81/75/60/51/8/6 bp);

гомологичные штаммы: pm112, pmd623, pm225.

19) *Chlamydomphila abortus* pm326 (230/171/161/159/141/90/82/81/75/60/57/51/8/6 bp);

гомологичные штаммы: pm234.

20) *Chlamydomphila felis* FP Pring (272/230/189/180/132/93/89/84/46/33/33 bp);

гомологичные штаммы: FP FEPN, FP Baker, FP Cello.

21) *Chlamydomphila caviae* GPIC (230/198/180/174/171/89/89/63/57/46/36/21/18 bp);

гомологичные штаммы: isolate GPIC.

Примечателен факт, что Т. Geens et al. (2005a) при сравнительной характеристике ряда генотипов хламидий вида *Chlamydophila psittaci* акцентировали *AluI*-ПДРФ-генотип-специфичные фрагменты, инициированные праймерами DV-1 и DV-2 (D. Vanrompay et al., 1998), коими для генотипов А и В являются характерные полосы длиной 110 bp и 117 bp, соответственно; для генотипа Е – отсутствие, характерных для генотипа А (110 bp) и генотипа В (117 bp) полос; для генотипа С – наличие фрагмента длиной 438 bp; для генотипов D и F – наличие характерных фрагментов длиной 471 bp и 222 bp, соответственно (Т. Geens et al., 2005a).

Анализ использованного в данной работе протокола генотипирования хламидий, с праймерами 5GPF и 3 GPB (В. Kaltenboeck et al., 1991, 1993) вызывает акцент *AluI*-ПДРФ-генотип-специфичных фрагментов тождественный результату, описанному Т. Geens et al. (2005a).

Анализ протокола генотипирования хламидий с праймерами CTU и CTL (Е. Denamur et al., 1991; С. Sayada et al., 1995; D. Vanrompay et al., 1997), являющихся прототипом праймеров DV-1 и DV-2 (D. Vanrompay et al., 1998; Т. Geens et al., 2005a) вызывает следующий акцент *AluI*-ПДРФ-генотип-специфичных фрагментов, коими для генотипов А и В остаются характерные полосы длиной 110 bp и 117 bp, соответственно; для генотипа Е – отсутствие, характерных для генотипа А (110 bp) и генотипа В (117 bp) полос; для генотипа С – наличие фрагмента длиной 442 bp; для генотипов D и F – наличие характерных фрагментов длиной 475 bp и 222 bp, соответственно.

В свете сравнительной характеристики нового генотипа хламидий (генотип G: штаммы «Ростиново-70», «250», «ПП-87», «КС-93») по маркерному *omp1*-гену, характерным его *AluI*-ПДРФ-фрагментом является полоса длиной 150 bp, генерируемая в результате реализации вышеописанных протоколов генотипирования хламидий. Ввиду наличия у генотипа G также *AluI*-ПДРФ-фрагмента, ранее уже акцентированного как характерная полоса для генотипа С, именно факт присутствия фрагмента размером 150 bp (для генотипа G) или его отсутствия (для генотипа С) имеет особую идентификационную ценность.

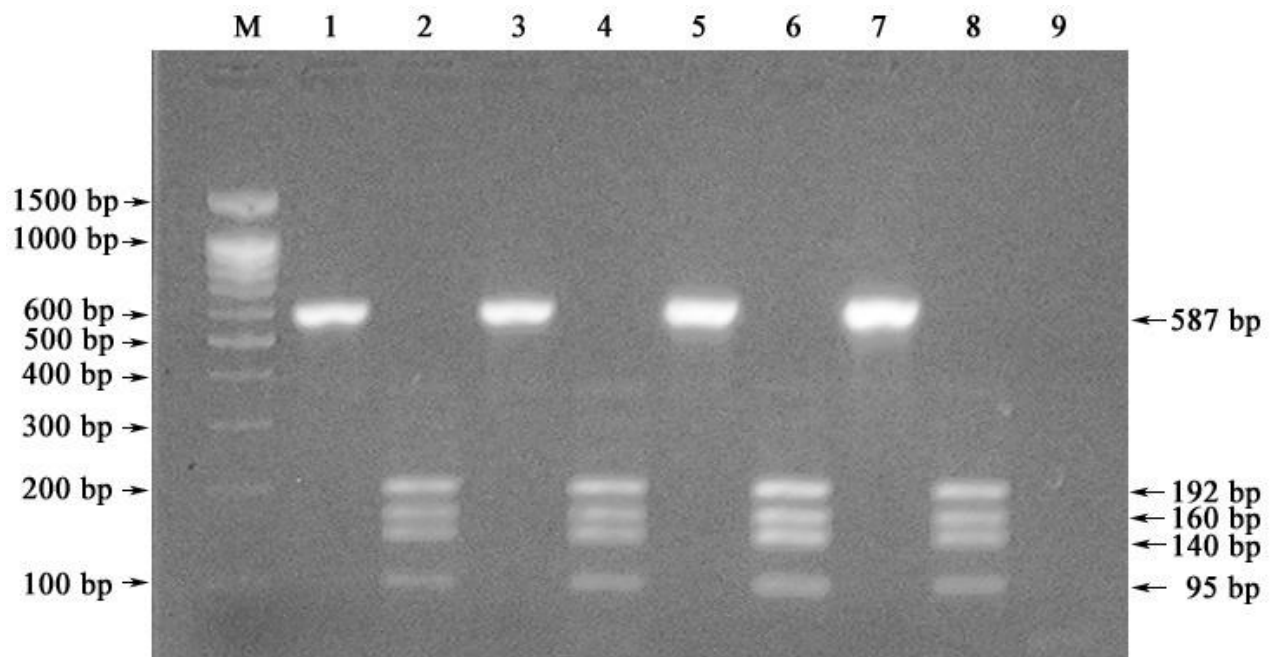
В целях же исчерпывающей идентификации генотипов хламидий целесообразно руководствоваться анализом полной картины ПЦР-ПДРФ-профилей с сопоставлением полученных данных с результатами секвенирования ПЦР-продуктов.

### 3.4.2. Сравнительная характеристика хламидий по *omp2*-гену

После проведения ПЦР, используя праймеры Ch1 и Ch2, с экстрактами ДНК очищенных штаммов хламидий «Ростиново-70», «250», «ПП-87» и «КС-93», у всех 4 штаммов были зарегистрированы одинаковые результаты в виде одного цельного ампликона локуса *omp2*-гена длиной 587 bp (рис. 17).

При последующем эндонуклеазном расщеплении ферментом *AluI* амплифицированного локуса *omp2*-гена были получены 4 дискретных фрагмента длиной 192, 160, 140 и 95 bp. (рис. 17).

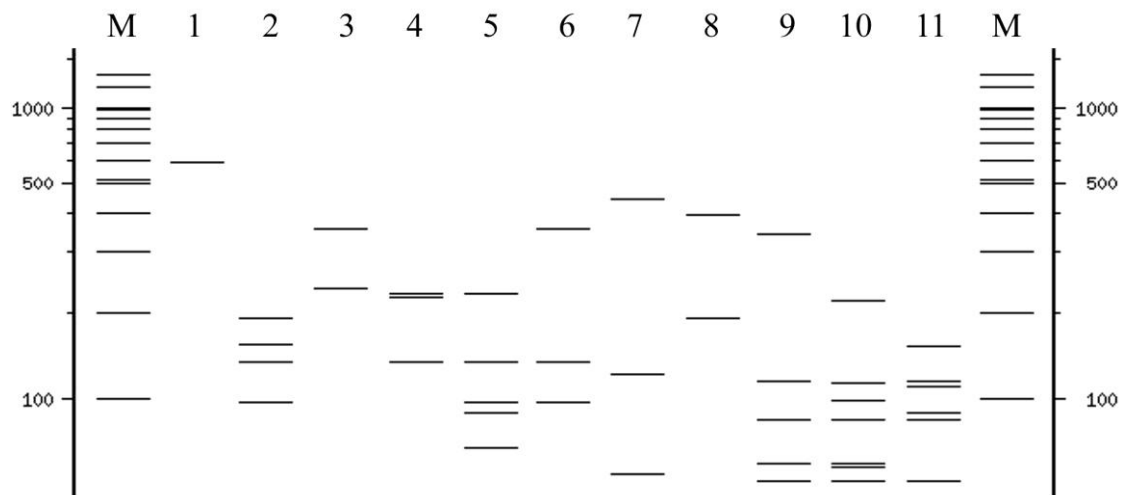




**Рис. 17. *Omp2*-ПЦР-ПДРФ-*AluI*-профиль штаммов хламидий из коллекции микроорганизмов ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»**

**Обозначения:** М) ДНК-маркеры; 1) «Ростиново-70»; 2) «Ростиново-70» (*AluI*); 3) «250»; 4) «250» (*AluI*); 5) «ПП-87»; 6) «ПП-87» (*AluI*); 7) «КС-93», 8) «КС-93» (*AluI*); 9)  $H_2O$ .

Следует отметить, что точные размеры ПЦР-ПДРФ-фрагментов установлены в результате секвенирования продуктов ПЦР-амплификации, данные которых использованы и при моделировании *Omp2*-ПЦР-ПДРФ-*AluI*-профиля хламидий семейства *Chlamydiaceae* (рис. 18).



**Рис. 18. *Omp2*-ПЦР-ПДРФ-*AluI*-профиль хламидий семейства *Chlamydiaceae* (праймеры Ch1 и Ch2)**

**Обозначения:** М – ДНК-маркеры. 1) *Chlamydophila* sp. Rostinovo-70 (цельный ПЦР фрагмент длиной 587 bp). 2) *Chlamydophila* sp. Rostinovo-70 (192/160/140/95 bp). 3) *Chlamydophila abortus* S26/3 (352/235 bp). 4) *Chlamydophila psittaci* 6BC (227/220/140 bp). 5) *Chlamydophila felis* FePn (225/140/95/85/45 bp). 6) *Chlamydophila caviae* GPIC (355/140/95 bp). 7) *Chlamydophila pneumoniae* TW-183 (444/127/13 bp). 8) *Chlamydophila pecorum* W73 (394/193 bp). 9) *Chlamydia suis* S45 (339/119/77/26/5 bp). 10) *Chlamydia muridarum* Nigg (216/117/97/77/26/22/5 bp). 11) *Chlamydia trachomatis* L1 (158/119/114/84/77/5 bp).

В результате использования протокола индикации хламидий праймерами Ch1 и Ch2 с последующей видовой идентификацией их путем анализа *omp2*-ПДРФ-*AluI*-профиля (J.C. Hartley et al., 2001) было установлено, что исследуемые экстракты ДНК штаммов «Ростиново-70», «250», «ПП-87» и «КС-93» дали аналогичные между собой результаты (рис. 17), но отличные от упоминаемых в данной работе других представителей семейства *Chlamydiaceae* (рис. 18).

*Omp2*-гетерогенность штамма «Ростиново-70» по отношению к штамму «6BC» *Chlamydophila psittaci* составляет около 4 (3,58) %, а по отношению к штамму «S26/3» *Chlamydophila abortus* – около 2 (1,36) %.

Таким образом, при проведении сравнительного анализа *omp2*-гена штаммов «Ростиново-70», «250», «ПП-87» и «КС-93» охарактеризован новый, ранее не изученный *omp2*-ПДРФ-*AluI*-профиль хламидий (рис. 17-18), а также установлено, что исследованные штаммы более когерентны к *Chlamydophila abortus*, нежели к *Chlamydophila psittaci*.

### **3.4.3. Сравнительная характеристика хламидий по *16S pPHK*, *23S pPHK* и наличию экстрахромосомной плазмиды (*pCp*)**

После проведения ПЦР, используя праймеры 16SIGF и 16SIGR, с экстрактами ДНК очищенных штаммов хламидий «Ростиново-70», «250», «ПП-87» и «КС-93», у всех 4 штаммов были зарегистрированы одинаковые результаты в виде одного цельного ампликона локуса *16S pPHK* длиной 294 bp (рис. 19, трек 1), при последующем эндонуклеазном расщеплении которого ферментом *AluI* были получены 2 дискретных фрагмента длиной 216 и 78 bp (рис. 19, трек 2).

После проведения ПЦР с праймерами U23F и 23SIGR были зарегистрированы одинаковые результаты в виде одного цельного ампликона локуса *23S pPHK* длиной 604 bp (рис. 19, трек 5), при последующем эндонуклеазном расщеплении которого ферментом *AluI* были получены 4 дискретных фрагмента длиной 461, 73, 59 и 11 bp (рис. 19, трек 6).

После проведения ПЦР, используя праймеры ML-PLF01 и ML-PLR01, были зарегистрированы одинаковые результаты в виде одного цельного ампликона локуса экстрахромосомной плазмиды длиной 469 bp (рис. 19, трек 3), при последующем эндонуклеазном расщеплении которого ферментом *AluI* были получены 3 дискретных фрагмента длиной 351, 89 и 29 bp (рис. 19, трек 4).

Праймеры на выявление экстрахромосомной плазмиды инициировали также амплификацию минорного неспецифичного фрагмента размером приблизительно 300 bp, который существенно не повлиял на корректную интерпретацию результата секвенирования.

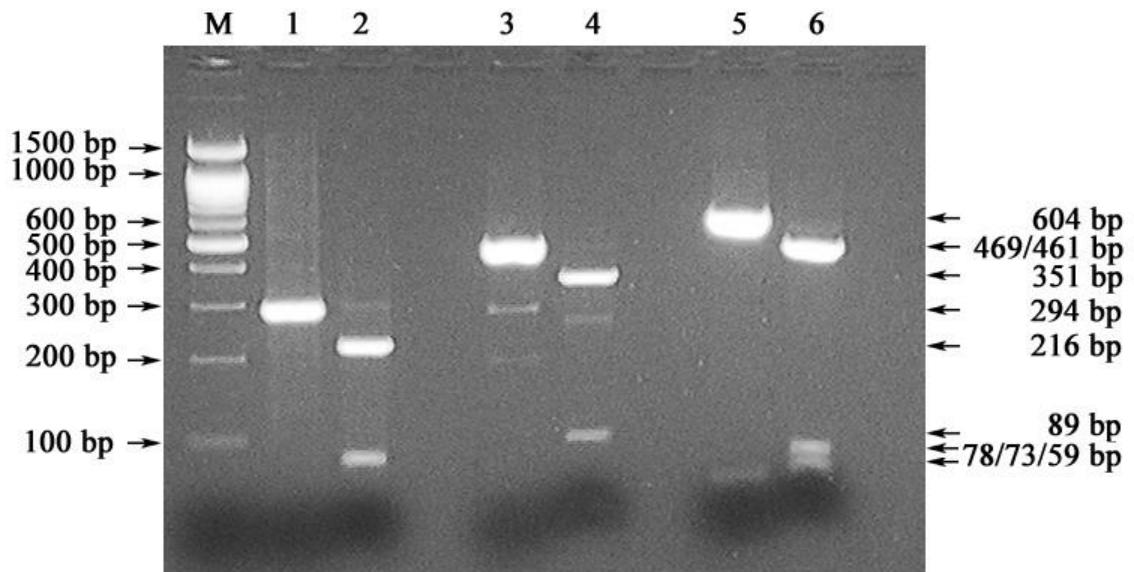


Рис. 19. *16S pPHK*-, *pCp*-, *23S pPHK*-ПЦР-ПДРФ-*AluI*-профиль штамма «Ростиново-70»

**Обозначения:**

М) ДНК-маркеры; 1) «Ростиново-70» (*16S pPHK*); 2) «Ростиново-70» (*16S pPHK-AluI*); 3) «Ростиново-70» (*pCp*); 4) «Ростиново-70» (*pCp-AluI*); 5) «Ростиново-70» (*23S pPHK*); 6) «Ростиново-70» (*23S pPHK-AluI*).

При анализе *16S* и *23S pPHK*-ПДРФ-*AluI*-профилей установлено, что исследуемые экстракты ДНК штаммов «Ростиново-70», «250», «ПП-87» и «КС-93», имеющие аналогичные между собой результаты, соответствуют общему профилю семейства *Chlamydiaceae*.

Следует отметить, что *16S pPHK*-гетерогенность штамма «Ростиново-70» по отношению к штамму «6BC» *Chlamydophila psittaci* составляет 1 нуклеотид, а по отношению к штамму «S26/3» *Chlamydophila abortus* – 3 нуклеотида.

Секвенированная последовательность частичного *23S pPHK*-гена штамма «Ростиново-70» имела 100% идентичность с соответствующими последовательностями штаммов «GD», «CT1» и «Par1», а *23S pPHK*-гетерогенность данных штаммов по отношению к штамму «6BC» *Chlamydophila psittaci* составляет 2 нуклеотида, а по отношению к штамму «S26/3» *Chlamydophila abortus* – 8 нуклеотидов.

Таким образом, установлено, что штаммы «Ростиново-70», «250», «ПП-87» и «КС-93» по маркерному гену *16S* и *23S pPHK* когерентны к *Chlamydophila psittaci*, нежели к *Chlamydophila abortus*.

Следует отметить, что по результатам выравнивания и *AluI* рестрикционного картирования амплифицируемых при помощи праймеров 16SIGF и 16SIGR нуклеотидных последовательностей ДНК локуса *16S pPHK*, а также амплифицируемых при помощи праймеров U23F и 23SIGR нуклеотидных последовательностей ДНК локуса *23S pPHK* известных представителей рода *Chlamydophila* можно сделать вывод, что для меж- и внутривидовой идентификации целесообразна процедура секвенирования продуктов ПЦР-амплификации.

Штаммы «Ростиново-70», «250», «ПП-87» и «КС-93» имеют экстрахромосомную плазмиду, чья нуклеотидная последовательность (GenBank A/N: DQ663790) на 100% идентична последовательности экстрахромосомной плазмиды штамма «84/2334» *Chlamydomophila psittaci*.

На основании видовой идентификации хламидий по генетическому (анализ *omp1*-, *omp2*-, *16S pPHK* и *23S pPHK*-генов хламидий и наличия экстрахромосомной плазмиды) и экологическому критерию штаммы хламидий «Ростиново-70», «250», «ПП-87» и «КС-93» могут быть предложены для выделения в новый вид хламидий, *Chlamydomophila parapsittaci* sp. nov.

Это действие продиктовано тем обстоятельством, что штаммы «Ростиново-70», «250», «ПП-87» и «КС-93», согласно генетическому критерию видовой идентификации занимают промежуточное положение между видами *Chlamydomophila psittaci* и *Chlamydomophila abortus*, т.е. по *omp1*- и *omp2*-генам они более когерентны к *Chlamydomophila abortus*, а по *16S pPHK*, *23S pPHK* и наличию экстрахромосомной плазмиды – *Chlamydomophila psittaci*.

Факт существования «промежуточных» штаммов и проблемы видовой идентификации *Chlamydomophila psittaci* от *Chlamydomophila abortus* подробно изучены М. Van Loock et al. (2003). Однако штаммы «Ростиново-70» (Х.З. Гаффаров с соавт., 1971), «250» (И.А. Курбанов с соавт., 1973, 1978), «ПП-87» (Р.Х. Равилов, 1998) и «КС-93» (Р.Х. Равилов, 1998) были изолированы как из плаценты абортировавших животных, так и органов абортированных плодов, т.е. экологически они обладают признаками *Chlamydomophila abortus*.

В тоже время, факт генетической схожести штаммов «Ростиново-70», «250», «ПП-87» и «КС-93», которые изолированы от млекопитающих при абортах, со штаммами «GD», «CT1» и «Par1», которые изолированы от птиц, вносит серьезный резонанс таксономического соотношения штаммов хламидий, компромиссом в котором является утверждение нового вида хламидий – *Chlamydomophila parapsittaci* sp. nov. с соотношением в данный вид также промежуточных штаммов *Chlamydomophila psittaci* «WC», «NJ1», «92-1293», «TT3», «7344/2», «GD», «CT1», «Par1», «84/2334», «R54», «VS225», «777B15» и «Prk/Daruma».

С учетом соотношения в новый вид *Chlamydomophila parapsittaci* sp. nov. штаммов «WC», «NJ1», «92-1293», «TT3», «7344/2», «GD», «CT1», «Par1», «84/2334», «R54», «VS225», «777B15» и «Prk/Daruma», одним из критериев таксономического размещения новых кандидатов в классификационной системе может служить вхождение в филогенетический спектр, фланкируемый штаммами «WC» и «777B15» при анализе *omp1*-гена (рис. 20).

Следует отметить, что такие штаммы, как «84/2334», «Prk/Daruma» и «R54», относятся к *Chlamydomophila psittaci* исключительно по экологическому критерию и наличию экстрахромосомной плазмиды. Фактически, по маркерным генам *23S pPHK*, *omp1* и вероятно по *omp2*-гену (к сожалению, данные по *omp2*-гену промежуточных штаммов *Chlamydomophila psittaci* «84/2334», «Prk/Daruma», «R54», а также «WC», «NJ1», «92-1293», «TT3», «7344/2», «GD», «CT1», «Par1», «VS225», «777B15» отсутствуют в GenBank) их

можно причислить к *Chlamydomphila abortus*, а по 16S рРНК они занимают промежуточное между *Chlamydomphila psittaci* и *Chlamydomphila abortus* положение.

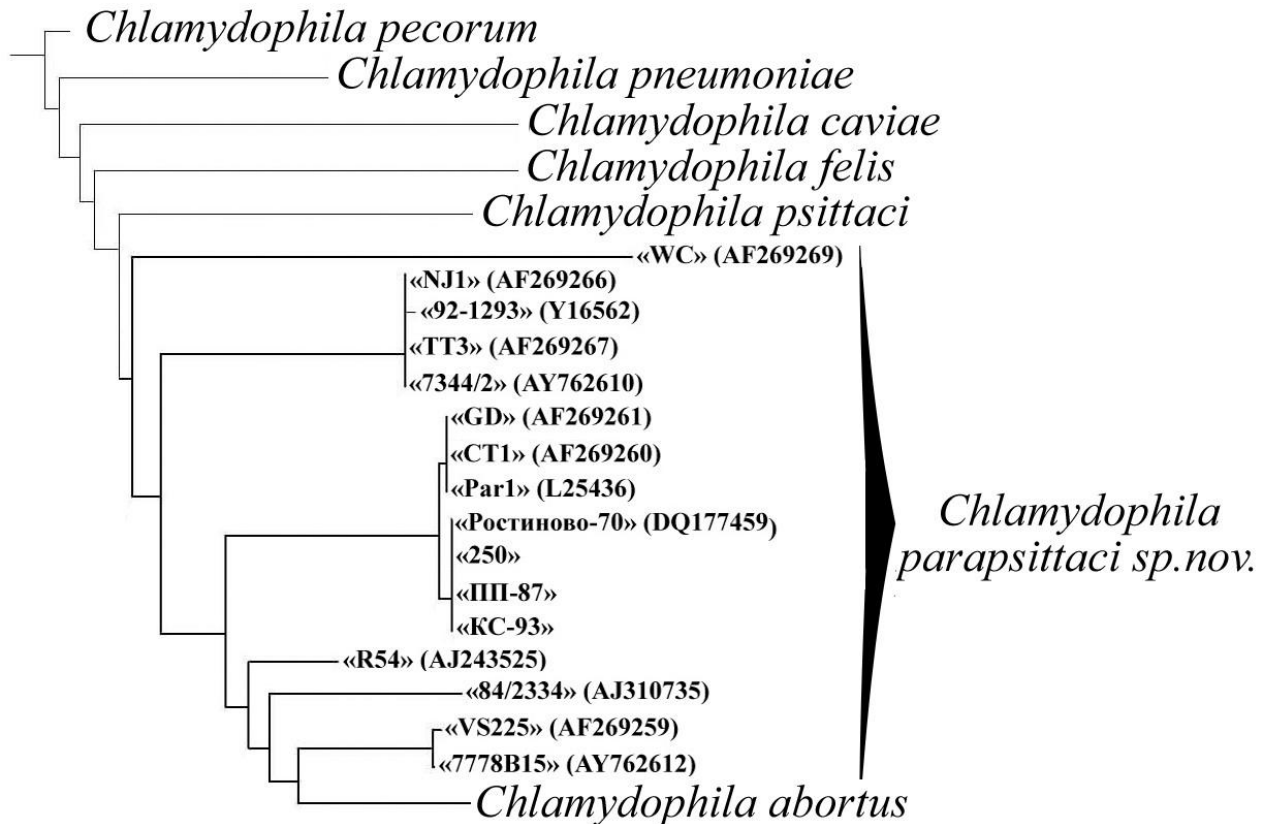


Рис. 20. Филограмма представителей рода *Chlamydomphila* (*omp1*-ген)

На сегодняшний день уже не вызывает сомнения необходимость проведения комплексной идентификации хламидий по широкому спектру генетических маркеров с учетом также и экологического критерия (М. Van Loock et al., 2003). Наши исследования подтверждают мнение ряда авторов, что для таксономической классификации видов хламидий необходимо также использовать гены, кодирующие белки наружной мембраны хламидий (*omp1* и *omp2*) (K.D. Everett et al., 1999b; J.C. Hartley et al., 2001; B. Kaltenboeck et al., 1991, 1993).

#### Описание вида *Chlamydomphila parapsittaci* sp. nov.

*Chlamydomphila parapsittaci* sp. nov. – вид хламидий рода *Chlamydomphila* семейства *Chlamydiaceae*, характеризующийся тем, что его представители согласно генетическому критерию идентификации обладают признаками промежуточного между *Chlamydomphila abortus* и *Chlamydomphila psittaci* вида, т.е. по *omp1*- и *omp2*-генам они когерентны к хламидиям вида *Chlamydomphila abortus*, а по 16S рРНК-, 23S рРНК-генам и (или исключительно по) наличию экстрахромосомной плазмиды – *Chlamydomphila psittaci*. Типичные штаммы: «Ростиново-70», «250», «ПП-87», «KC-93», «WC», «NJ1», «92-1293», «TT3», «7344/2», «GD», «CT1», «Par1», «84/2334», «Prk/Daruma», «R54», «VS225» и «777B15».

## ВЫВОДЫ

1. По результатам таксономической идентификации хламидий по генетическому (анализ *omp1*-, *omp2*-, *16S pPHK* и *23S pPHK*-генов хламидий и наличия экстрахромосомной плазмиды) и экологическому (изолированы от млекопитающих при абортах) критериям штаммы хламидий «Ростиново-70», «250», «ПП-87» и «КС-93» из коллекции микроорганизмов ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» характеризуются признаком нового ранее не изученного генотипа хламидий, обозначенного нами «генотип G» и предложены для выделения в новый вид хламидий, *Chlamydophila parapsittaci* sp. nov.
2. Разработанный фенольно-детергентный способ выделения ДНК хламидий обеспечивает получение препаратов ДНК хламидий высокой степени чистоты (спектрофотометрические показатели полученных препаратов ДНК колебались в пределах 1,8-2,0) и нативности, пригодных для молекулярно-генетических исследований. Практический выход ДНК хламидий составил 18,7-20,4 мкг/мг сухой массы микроорганизмов.
3. Разработанная методика высокоточной ПЦР обеспечивает эффективную наработку специфичных ампликонов с исключением амплификации неспецифичных продуктов реакции за счет использования праймеров, состоящих из 3'-участка, комплементарного последовательности мишени, и 5'-участка, не комплементарного последовательности-мишени, с потенциальной температурой гибридизации по всей длине, превышающей температуру отжига их 3'-комплементарного участка на 5-10<sup>0</sup>С, а также применения фиксированной температуры отжига, соответствующей потенциальному оптимуму гибридизации по всей длине олигонуклеотидов.
4. Разработанный способ защиты ОТ-ПЦР от контаминации продуктами амплификации на основе разрушающего действия урацил-ДНК-гликозилазы (из *E. coli*) на урацил-содержащую ДНК в варианте «1 пробирка, 2 этапа» при использовании M-MuLV обратной транскриптазы и Taq ДНК полимеразы путем комбинированного использования dTTP/dUTP предотвращает возможность реамплификации урацил-содержащих ампликонов в виду того, что урацил-содержащая ДНК (контаминант) теряет роль мишени из-за выщепления из нее свободного урацила ферментом урацил-ДНК-гликозилазой (из *E. coli*) в процессе реакции.
5. На основании анализа эпизоотологической ситуации, выделения возбудителя, а также положительных результатов бактериоскопических, серологических и молекулярно-генетических исследований установлена хламидийная природа различных патологий у клеточных и домашних плотоядных животных, птиц, рептилий и амфибий.
6. Подобранные условия ПЦР-индикации и ПЦР-ПДРФ-идентификации хламидий в исследуемом биоматериале обеспечивают высокую чувствительность и специфичность тестов.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

На основании проведенных исследований внесены следующие практические предложения:

1. Предложен фенольно-детергентный способ выделения ДНК хламидий (Патент РФ на изобретение № 2230120 – «Способ выделения ДНК микроорганизмов»), позволяющий получать чистые, нативные и концентрированные препараты нуклеиновых кислот возбудителя.
2. Предложена методика высокоточной ПЦР (Патент РФ на изобретение № 2299240 – «Способ проведения ПЦР»), который обеспечивает эффективную наработку специфичных ампликонов с исключением амплификации неспецифичных продуктов реакции.
3. Предложен способ защиты ОТ-ПЦР от контаминации продуктами амплификации на основе разрушающего действия урацил-ДНК-гликозилазы (из *E. coli*) (Патент РФ на изобретение № 2307167), предотвращающий возможность реамплификации урацил-содержащих ампликонов при использовании заявленного протокола ОТ-ПЦР в варианте «1 пробирка 2 этапа».
4. Предложены условия проведения индикации и идентификации хламидий методами ПЦР и ПЦР-ПДРФ в исследуемом биоматериале, обеспечивающие высокую чувствительность и специфичность анализа.
5. Охарактеризован новый генотип хламидий («генотип G»), по результатам молекулярно-генетических исследований типичных представителей рода *Chlamydopila* штаммов «Ростиново-70», «250», «ПП-87» и «КС-93», с предложением выделения изученных штаммов в новый вид хламидий, *Chlamydophila parapsittaci* sp.nov., что существенно повышает уровень знаний о природе хламидийных инфекций и позволяет эффективно использовать полученную информацию в практической деятельности ветеринарной и гуманитарной медицины.
6. Подготовлены методические рекомендации для использования опубликованных материалов в учебном процессе факультетов ветеринарной медицины сельскохозяйственных ВУЗов, для повышения квалификации специалистов ветеринарных лабораторий и при научных исследованиях:
  - «Методические рекомендации по индикации и идентификации микроорганизмов вида *Chlamydia psittaci* методом полимеразной цепной реакции», утверждены директором ВНИВИ 21 ноября 2002 г.
  - «Индикация и идентификация микроорганизмов вида *Chlamydia psittaci* методом полимеразной цепной реакции (методические рекомендации)», утверждены Ученым советом КГАВМ 24 декабря 2002 г.
  - «Методические рекомендации по диагностике хламидийных инфекций у рептилий, амфибий и декоративных птиц», утверждены Ученым советом КГАВМ 10 июня 2008 г.
  - «Методические рекомендации по идентификации генотипов хламидий по маркерному гену (*omp1*)», утверждены Ученым советом КГАВМ 25 декабря 2008 г.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Работы, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ

- 1) Вафин, Р.Р. Индикация и идентификация хламидий методом полимеразной цепной реакции / Р.Р. Вафин, Р.Х. Равилов, Т.Х. Фаизов // Ученые записки КГАВМ. – Казань, 2003. – Т. 174. – С. 51-59.
- 2) Вафин, Р.Р. Фенольно-детергентный метод выделения ДНК хламидий / Р.Р. Вафин, Р.Х. Равилов, Т.Х. Фаизов // Ученые записки КГАВМ. – Казань, 2003. – Т. 174. – С. 59-66.
- 3) Вафин, Р.Р. Молекулярно-генетический анализ штаммов хламидий по omp1- и omp2-генам / Р.Р. Вафин, Р.Х. Равилов, Х.З. Гаффаров, А.З. Равилов, Г.М. Исхаков, И.Х. Бакиров, Р.Р. Вафин // Ученые записки КГАВМ. – Казань, 2006. – Т. 190. – С. 13-25.
- 4) Вафин, Р.Р. Разработка методики высокоточной ПЦР / Р.Р. Вафин, Р.Х. Равилов, Р.Р. Вафин, И.Х. Бакиров, Т.М. Ахметов, О.Г. Зарипов, Э.Ф. Валиуллина // Ж. Ветеринарная практика. – 2006/2007. – № 4 (35). – С. 15-22.
- 5) Вафин, Р.Р. Сравнительная характеристика штаммов хламидий по omp1-гену / Р.Р. Вафин, Р.Х. Равилов, Х.З. Гаффаров, А.З. Равилов, Г.М. Исхаков, И.Х. Бакиров, Р.Р. Вафин // Ж. Ветеринарная практика. – 2007. – № 3 (38). – С. 54-59.
- 6) Вафин, Р.Р. О номенклатуре и классификации хламидий / Р.Р. Вафин, Р.Х. Равилов, Х.З. Гаффаров, А.З. Равилов, Г.М. Исхаков, И.Х. Бакиров, В.Н. Кашов, Р.Р. Вафин // Ж. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2007. – № 4. – С. 17-25.
- 7) Вафин, Р.Р. Изучение 16S рРНК, 23S рРНК фрагментов ДНК и экстрахромосомальной плазмиды хламидий / Р.Р. Вафин, М.З. Каримов, Р.Х. Равилов // Ученые записки КГАВМ. – Казань, 2008. – Т. 192. – С. 22-25.
- 8) Вафин, Р.Р. Проблема контаминации в ПЦР-лаборатории. Способы деконтаминации / Р.Р. Вафин, И.В. Пикалова, Ф.Ф. Замалиева, Т.М. Ахметов, Р.Х. Равилов // Ж. Ветеринарная практика. – 2008. – № 4 (43). – С. 56-61.
- 9) Вафин, Р.Р. Идентификация нового генотипа хламидий по маркерному гену / Р.Р. Вафин, Р.Х. Равилов, Х.З. Гаффаров, А.З. Равилов, Г.М. Исхаков, И.Х. Бакиров, Р.Р. Вафин // Ж. Ветеринарная практика. – 2009. – № 1 (44). – С. 82-90.
- 10) Иванов, А.В. Характеристика нового генотипа хламидий по маркерному гену / А.В. Иванов, Р.Р. Вафин, Р.Х. Равилов, Х.З. Гаффаров, Г.М. Исхаков, И.Х. Бакиров // Ж. Ветеринарный врач. – 2009. – № 2. – С. 18-22.

### Монография

- 11) Бакиров, И.Х. Лабораторная диагностика хламидиозов животных / И.Х. Бакиров, Р.Р. Вафин, Р.Х. Равилов // Монография. – Тобольск: ГОУ ВПО «ТГПИ им. Д.И. Менделеева», 2008. – 150 с.



### Патенты РФ на изобретения

- 12) Вафин, Р.Р. Способ выделения ДНК микроорганизмов. Патент на изобретение № 2230120 / Р.Р. Вафин, Л.И. Зайнуллин, Т.Х. Фаизов, Р.Х. Равилов, А.М. Алимов, Р.Р. Вафин // Официальный бюллетень «Изобретения. Полезные модели». – опубликовано 10.06.2004. – Бюл. № 16.
- 13) Вафин, Р.Р. Способ проведения ПЦР. Патент на изобретение № 2299240 / Р.Р. Вафин, Р.Р. Вафин, Т.М. Ахметов, Ш.К. Шакиров, Ф.Ф. Замалиева, И.В. Пикалова, Р.Х. Равилов, И.Х. Бакиров // Официальный бюллетень «Изобретения. Полезные модели». – опубликовано 20.05.2007. – Бюл. № 14.
- 14) Вафин, Р.Р. Способ защиты ОТ-ПЦР от контаминации продуктами амплификации на основе разрушающего действия урацил ДНК гликозилазы. Патент на изобретение № 2307167 / Р.Р. Вафин, Р.Р. Вафин, Ф.Ф. Замалиева, И.В. Пикалова, З. Сташевски, Т.М. Ахметов, Ш.К. Шакиров, Р.Х. Равилов // Официальный бюллетень «Изобретения. Полезные модели». – опубликовано 27.09.2007. – Бюл. № 27.

### Методические рекомендации

- 15) Вафин, Р.Р. Индикация и идентификация микроорганизмов вида *Chlamydia psittaci* методом полимеразной цепной реакции (методические рекомендации) / Р.Р. Вафин, Р.Х. Равилов, Т.Х. Фаизов, А.Р. Садриев, А.М. Алимов // Методические рекомендации. – Казань, КГАВМ. – 2002. – 18 с.
- 16) Вафин, Р.Р. Методические рекомендации по индикации и идентификации микроорганизмов вида *Chlamydia psittaci* методом молимеразной цепной реакции / Р.Р. Вафин, Т.Х. Фаизов, А.З. Равилов, А.М. Алимов, Р.Х. Равилов // Казань, ВНИВИ. – 2002. – 18 с.
- 17) Равилов, Р.Х. Методические рекомендации по диагностике хламидийных инфекций у рептилий, амфибий и декоративных птиц (методические указания) / Р.Х. Равилов, В.В. Герасимов, Р.Р. Вафин, А.В. Буракова, А.В. Кострова // Казань, ЦИТ КГАВМ. – 2008. – 24 с.
- 18) Вафин, Р.Р. Идентификация генотипов хламидий по маркерному гену *omp1* (методические рекомендации) / Р.Р. Вафин, Р.Х. Равилов, Г.М. Исхаков, И.Х. Бакиров // Казань, КГАВМ. – 2008. – 14 с.

### Публикации в материалах конференций, научных и научно-практических журналах и изданиях

- 19) Вафин, Р.Р. К вопросу о роли хламидий в патологии лисиц и песцов / Р.Р. Вафин, Р.Х. Равилов // Материалы научно-производственной конференции по актуальным проблемам ветеринарии и зоотехнии. – Казань, 2001. – Ч. 1. – С. 196-198. [тезисы].
- 20) Вафин, Р.Р. Хламидиоз лисиц и песцов / Р.Р. Вафин // Материалы научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии и ветеринарной медицины мелких домашних животных». – Киров, 2001. – С. 59-61. [тезисы].

- 21) Вафин, Р.Р. Оптимизация методов выделения ДНК хламидий / Р.Р. Вафин, Р.Х. Равилов // Материалы научно-практической конференции молодых ученых и специалистов РТ. – Казань, 2001. – С. 68. [тезисы].
- 22) Вафин, Р.Р. Сравнительное изучение штаммов хламидий в ПЦР с специфическими и универсальными праймерами / Р.Р. Вафин // Материалы Всероссийской научно-производственной конференции по актуальным проблемам ветеринарии и зоотехнии. – Казань, КГАВМ. – 2002. – Ч. 1. – С. 16-18. [тезисы].
- 23) Вафин, Р.Р. Фенольно-детергентный метод выделения ДНК хламидий и сальмонелл / Р.Р. Вафин, Р.Х. Равилов, Л.И. Зайнуллин, Т.Х. Фаизов, А.М. Алимов, Р.Р. Вафин // Материалы Всероссийской научно-производственной конференции по актуальным проблемам ветеринарии и зоотехнии. – Казань, КГАВМ. – 2002. – Ч. 1. – С. 18-20. [тезисы].
- 24) Вафин, Р.Р. Дифференциация возбудителей хламидиоза при помощи RAPD-PCR / Р.Р. Вафин, Р.Х. Равилов, Т.Х. Фаизов // Ж. Ветеринарный врач. – 2002. – № 3. – С. 73-75 [статья].
- 25) Вафин, Р.Р. Диагностика хламидиоза плотоядных животных методом полимеразной цепной реакции / Р.Р. Вафин, Р.Х. Равилов, Т.Х. Фаизов // Сборник статей: Актуальные вопросы ветеринарной медицины мелких домашних животных. – Екатеринбург, 2003. – С. 28-30. [статья].
- 26) Вафин, Р.Р. Молекулярно-генетическая диагностика хламидиоза мелких домашних животных / Р.Р. Вафин, Р.Х. Равилов // Материалы XI Московского международного ветеринарного конгресса. – М., 2003. – С. 12. [тезисы].
- 27) Вафин, Р.Р. ПЦР-диагностика хламидийных инфекций у собак и кошек / Р.Р. Вафин, А.В. Куприянова, Р.Х. Равилов // Материалы IV региональной научно-практической конференции «Ветеринарная медицина. Современные проблемы и перспективы развития». – Саратов, 2004. – С. 49-50. [тезисы].
- 28) Вафин, Р.Р. Индикация хламидиоза у собак и кошек методом полимеразной цепной реакции / Р.Р. Вафин, А.В. Куприянова, Р.Х. Равилов // Материалы XII международного московского конгресса по болезням мелких домашних животных. – М., 2004. – С. 79. [тезисы].
- 29) Бакиров, И.Х. Индикация и идентификация хламидий в ПЦР со специфическими праймерами / И.Х. Бакиров, Р.Р. Вафин, Р.Х. Равилов, Г.М. Исхаков // Сборник статей: Ветеринарная медицина домашних животных. – Казань, 2005. – С. 26-30. [статья].
- 30) Вафин, Р.Р. Результаты секвенирования штаммов хламидий, выделенных от сельскохозяйственных и мелких животных / Р.Р. Вафин, Р.Х. Равилов, Х.З. Гаффаров, А.З. Равилов, Г.М. Исхаков, И.Х. Бакиров, Р.Р. Вафин // Сборник статей: Ветеринарная медицина домашних животных. – Казань, 2005. – С. 34-37. [статья].
- 31) Вафин, Р.Р. Разработка техники мультиплексной ОТ-ПЦР на выявление РVУ и РVХ в системе защиты от контаминации продуктами амплификации на основе разрушающего действия урацил ДНК гликозилазы / Р.Р. Вафин,

- И.В. Пикалова, Ф.Ф. Замалиева, З. Сташевски, О.Г. Зарипов, Е.Г. Варламова, А.И. Баландин // Сборник статей: Научные труды молодых ученых ГНУ ТатНИИСХ. – Казань, 2005. – С. 41-47. [статья].
- 32) Вафин, Р.Р. Разработка новой эффективной методики высокоспецифичной ПЦР / Р.Р. Вафин, Т.М. Ахметов, Ш.К. Шакиров, Ф.Ф. Замалиева, И.В. Пикалова, Р.Х. Равилов, И.Х. Бакиров // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Пути мобилизации биологических ресурсов повышения продуктивности пашни, энергоресурсосбережения и производства конкурентноспособной сельскохозяйственной продукции». – Казань, 2005. – С. 467-470. [тезисы].
- 33) Бакиров, И.Х. Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов продуктов амплификации хламидий / И.Х. Бакиров, Р.Р. Вафин // Материалы научно-практической конференции «Научно-практическая конференция молодых ученых». – Казань, 2006. – С. 8. [тезисы].
- 34) Равилов, Р.Х. Индикация хламидий у попугаев методом полимеразной цепной реакции (тезисы) / Р.Х. Равилов, А.В. Кострова, Р.Р. Вафин // доклады 2-3 й московской орнитолого-зоологической конференции. – М., 2006. – С. 12. [тезисы].
- 35) Равилов, Р.Х. Молекулярно-генетическая диагностика хламидиоза у попугаев / Р.Х. Равилов, А.В. Кострова, Р.Р. Вафин // Сборник статей: Ветеринарная медицина домашних животных. – Казань, 2006. – С. 80-82. [статья].
- 36) Вафин, Р.Р. Оптимизация способов генотипирования крупного рогатого скота по гену каппа-казеина / Р.Р. Вафин, Т.М. Ахметов, Э.Ф. Валиуллина, О.Г. Зарипов, С.В. Тюлькин // Ж. Ветеринарная практика. – 2007. – № 2 (37). – С. 54-59. [статья].
- 37) Vafin, R.R. On the nomenclature and classification of chlamydiae / R.R. Vafin, R.Kh. Ravilov, Kh. Z. Gaffarov, A.Z. Ravilov, G.M. Iskhakov, I.Kh. Bakirov, V.N. Kashov // Molecular Genetics, Microbiology and Virology. – 2007. – V. 22. - № 4. – P. 155-164. [статья].
- 38) Вафин, Р.Р. Анализ генома хламидий по 16S рРНК, 23S рРНК и плазмиде / Р.Р. Вафин, М.З. Каримов, Р.Х. Равилов // Сборник статей: Ветеринарная медицина домашних животных. – Казань, 2007. – С. 56-58. [статья].
- 39) Равилов, Р.Х. ПЦР-диагностика хламидиоза у попугаев / Р.Х. Равилов, А.В. Кострова, Р.Р. Вафин // Материалы XV международного Московского конгресса по болезням мелких домашних животных. – М., 2007. – С. 144-145. [тезисы].
- 40) Вафин, Р.Р. Высокоточный вариант ПЦР / Р.Р. Вафин, Т.М. Ахметов, Р.Х. Равилов, И.Х. Бакиров // Сборник статей: Ветеринарная медицина домашних животных. – Казань, 2008. – С. 61-67. [статья].

**Публикации в глобальной электронной базе данных генбанков  
NCBI (США), EMBL (Великобритания), DDBJ (Япония).**

- 41) National Center for Biotechnology Information [Электронный ресурс]: NCBI GenBank (A/N: DQ177459 – *Chlamydophila* sp. Rostinovo-70 outer membrane protein (ompA) gene, partial cds.) / Vafin,R.R., Ravilov,R.H., Gaffarov,H.Z., Ravilov,A.Z., Ishakov,G.M., Bakirov,I.H. and Vafin,R.R. – Электрон. дан. – GenBank (NCBI), Bethesda, MD, USA, 2005. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=74423036>, свободный.
- 42) EMBL-European Bioinformatics Institute [Электронный ресурс]: EMBL Nucleotide Sequence Database (A/N: DQ177459 – *Chlamydophila* sp. Rostinovo-70 outer membrane protein (ompA) gene, partial cds.) / Vafin,R.R., Ravilov,R.H., Gaffarov,H.Z., Ravilov,A.Z., Ishakov,G.M., Bakirov,I.H. and Vafin,R.R. – Электрон. дан. – EMBL Nucleotide Sequence Database (EBI), Hinxton, UK, 2005. – Режим доступа: [http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+\[EMBL:DQ177459\]+-newId](http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+[EMBL:DQ177459]+-newId), свободный.
- 43) DNA Data Bank of Japan [Электронный ресурс]: DDBJ (A/N: DQ177459 – *Chlamydophila* sp. Rostinovo-70 outer membrane protein (ompA) gene, partial cds.) / Vafin,R.R., Ravilov,R.H., Gaffarov,H.Z., Ravilov,A.Z., Ishakov,G.M., Bakirov,I.H. and Vafin,R.R. – Электрон. дан. – DNA Data Bank of Japan (DDBJ), Mishima, Japan, 2005. – Режим доступа: <http://getentry.ddbj.nig.ac.jp/A/N/search/mode>, свободный.
- 44) National Center for Biotechnology Information [Электронный ресурс]: NCBI GenBank (A/N: DQ177460 – *Chlamydophila* sp. Rostinovo-70 outer membrane protein 2 (omp2) gene, partial cds.) / Vafin,R.R., Ravilov,R.H., Gaffarov,H.Z., Ravilov,A.Z., Ishakov,G.M., Bakirov,I.H. and Vafin,R.R. – Электрон. дан. – GenBank (NCBI), Bethesda, MD, USA, 2005. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=74423038>, свободный.
- 45) EMBL-European Bioinformatics Institute [Электронный ресурс]: EMBL Nucleotide Sequence Database (A/N: DQ177460 – *Chlamydophila* sp. Rostinovo-70 outer membrane protein 2 (omp2) gene, partial cds.) / Vafin,R.R., Ravilov,R.H., Gaffarov,H.Z., Ravilov,A.Z., Ishakov,G.M., Bakirov,I.H. and Vafin,R.R. – Электрон. дан. – EMBL Nucleotide Sequence Database (EBI), Hinxton, UK, 2005. – Режим доступа: [http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+\[EMBL:DQ177460\]+-newId](http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+[EMBL:DQ177460]+-newId), свободный.
- 46) DNA Data Bank of Japan [Электронный ресурс]: DDBJ (A/N: DQ177460 – *Chlamydophila* sp. Rostinovo-70 outer membrane protein 2 (omp2) gene, partial cds.) / Vafin,R.R., Ravilov,R.H., Gaffarov,H.Z., Ravilov,A.Z., Ishakov,G.M., Bakirov,I.H. and Vafin,R.R. – Электрон. дан. – DNA Data Bank of Japan (DDBJ), Mishima, Japan, 2005. – Режим доступа: <http://getentry.ddbj.nig.ac.jp/A/N/search/mode>, свободный.
- 47) National Center for Biotechnology Information [Электронный ресурс]: NCBI GenBank (A/N: DQ663788 – *Chlamydophila* sp. Rostinovo-70 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.) / Vafin,R.R., Ravilov,R.H., Gaffarov,H.Z., Ravilov,A.Z., Ishakov,G.M., Bakirov,I.H., Kashov,V.N. and Vafin,R.R. –

- Электрон. дан. – GenBank (NCBI), Bethesda, MD, USA, 2006. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=74423038>, свободный.
- 48) EMBL-European Bioinformatics Institute [Электронный ресурс]: EMBL Nucleotide Sequence Database (A/N: DQ663788 – *Chlamydophila* sp. Rostinovo-70 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.) / Vafin,R.R., Ravilov,R.H., Gaffarov,H.Z., Ravilov,A.Z., Ishakov,G.M., Bakirov,I.H., Kashov,V.N. and Vafin,R.R. – Электрон. дан. – EMBL Nucleotide Sequence Database (EBI), Hinxton, UK, 2006. – Режим доступа: [http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+\[EMBL:DQ663788\]+-newId](http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+[EMBL:DQ663788]+-newId), свободный.
- 49) DNA Data Bank of Japan [Электронный ресурс]: DDBJ (A/N: DQ663788 – *Chlamydophila* sp. Rostinovo-70 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.) / Vafin,R.R., Ravilov,R.H., Gaffarov,H.Z., Ravilov,A.Z., Ishakov,G.M., Bakirov,I.H., Kashov,V.N. and Vafin,R.R. – Электрон. дан. – DNA Data Bank of Japan (DDBJ), Mishima, Japan, 2006. – Режим доступа: <http://getentry.ddbj.nig.ac.jp>, A/N search mode, свободный.
- 50) National Center for Biotechnology Information [Электронный ресурс]: NCBI GenBank (A/N: DQ663789 – *Chlamydophila* sp. Rostinovo-70 23S ribosomal RNA gene, partial sequence.) / Vafin,R.R., Ravilov,R.H., Gaffarov,H.Z., Ravilov,A.Z., Ishakov,G.M., Bakirov,I.H., Kashov,V.N. and Vafin,R.R. – Электрон. дан. – GenBank (NCBI), Bethesda, MD, USA, 2006. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=110180586>, свободный.
- 51) EMBL-European Bioinformatics Institute [Электронный ресурс]: EMBL Nucleotide Sequence Database (A/N: DQ663789 – *Chlamydophila* sp. Rostinovo-70 23S ribosomal RNA gene, partial sequence.) / Vafin,R.R., Ravilov,R.H., Gaffarov,H.Z., Ravilov,A.Z., Ishakov,G.M., Bakirov,I.H., Kashov,V.N. and Vafin,R.R. – Электрон. дан. – EMBL Nucleotide Sequence Database (EBI), Hinxton, UK, 2006. – Режим доступа: [http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+\[EMBL:DQ663789\]+-newId](http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+[EMBL:DQ663789]+-newId), свободный.
- 52) DNA Data Bank of Japan [Электронный ресурс]: DDBJ (A/N: DQ663789 – *Chlamydophila* sp. Rostinovo-70 23S ribosomal RNA gene, partial sequence.) / Vafin,R.R., Ravilov,R.H., Gaffarov,H.Z., Ravilov,A.Z., Ishakov,G.M., Bakirov,I.H., Kashov,V.N. and Vafin,R.R. – Электрон. дан. – DNA Data Bank of Japan (DDBJ), Mishima, Japan, 2006. – Режим доступа: <http://getentry.ddbj.nig.ac.jp>, A/N search mode, свободный.
- 53) National Center for Biotechnology Information [Электронный ресурс]: NCBI GenBank (A/N: DQ663790 – *Chlamydophila* sp. Rostinovo-70 plasmid pCp hypothetical protein genes, partial cds.) / Vafin,R.R., Ravilov,R.H., Gaffarov,H.Z., Ravilov,A.Z., Ishakov,G.M., Bakirov,I.H., Kashov,V.N. and Vafin,R.R. – Электрон. дан. – GenBank (NCBI), Bethesda, MD, USA, 2006. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&Id=110180586>, свободный.

- 54) EMBL-European Bioinformatics Institute [Электронный ресурс]: EMBL Nucleotide Sequence Database (A/N: DQ663790 – Chlamydophila sp. Rostinovo-70 plasmid pCp hypothetical protein genes, partial cds.) / Vafin,R.R., Ravilov,R.H., Gaffarov,H.Z., Ravilov,A.Z., Ishakov,G.M., Bakirov,I.H., Kashov,V.N. and Vafin,R.R. – Электрон. дан. – EMBL Nucleotide Sequence Database (EBI), Hinxton, UK, 2006. – Режим доступа: [http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+\[EMBL:DQ663790\]+-newId](http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+[EMBL:DQ663790]+-newId), свободный.
- 55) DNA Data Bank of Japan [Электронный ресурс]: DDBJ (A/N: DQ663790 – Chlamydophila sp. Rostinovo-70 plasmid pCp hypothetical protein genes, partial cds.) / Vafin,R.R., Ravilov,R.H., Gaffarov,H.Z., Ravilov,A.Z., Ishakov,G.M., Bakirov,I.H., Kashov,V.N. and Vafin,R.R. – Электрон. дан. – DNA Data Bank of Japan (DDBJ), Mishima, Japan, 2006. – Режим доступа: <http://getentry.ddbj.nig.ac.jp>, A/N search mode, свободный.